

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

---

**Der Einfluss von CD30-Signalen auf die Aktivierung  
und Differenzierung muriner T-Zellen**

---



vorgelegt von Anna Pollithy  
am 21.01.2016

ANGEFERTIGT AM HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN  
DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND UMWELT

1. Gutachter:	Herr PD Dr. Josef Mautner
2. Gutachter:	Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß
Tag der Einreichung:	21.01.2016
Tag der mündlichen Prüfung:	01.09.2016

***„Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung“***

**(Charles Darwin)**

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>III.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.2	Die T-Zellentwicklung im Thymus.....	1
1.3	Aktivierung von T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen .....	4
1.3.1	Die Struktur der Milz.....	4
1.3.2	Die Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	5
1.3.2.1	Die Differenzierung zu CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen .....	6
1.3.2.2	Die Differenzierung von follikulären T-Helferzellen und deren Funktion bei der Entstehung von Keimzentren während der T-Zell-abhängigen Immunantwort.....	8
1.3.3	Die CD8 <sup>+</sup> Effektor-T-Zell-vermittelte Immunantwort.....	12
1.3.3.1	Die Aktivierung und Differenzierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	12
1.3.3.2	Die Erschöpfung der CD8 <sup>+</sup> T Zell-Antwort.....	12
1.3.4	Die Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen.....	14
1.4	Der CD30-Rezeptor .....	16
1.5	Mausmodelle.....	18
1.5.1	Die LMP1/CD30 <sup>flSTOP</sup> -Mausline .....	18
1.5.2	Die CD30 <sup>flSTOP</sup> -Mausline .....	19
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>21</b>
3.1	Der Einfluss des CD30-Signals auf T-Zellen.....	21
3.1.1	Die T-Zell-spezifische Expression der Transgene LMP1/CD30, CD30 und des Reporters hCD2 .....	21
3.1.2	Die T-Zell-spezifische Expression und Regulation von CD30.....	23
3.1.3	Die Expression von LMP1/CD30 und CD30 auf T-Zellen führt zur Splenomegalie und erhöhten Zellzahlen.....	25
3.1.4	Delokalisierung der T-Zellen in den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse.....	27
3.1.5	Konstitutiv aktive CD30-Signale in T-Zellen führen zur Verminderung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen.....	27
3.1.6	Konstitutive CD30-Signale führen zur verstärkten Expression von Gedächtnis-T-Zell-Markern .....	30
3.1.7	Das konstitutiv aktive CD30-Signal führt zur Expression von T-Zell-spezifischen Aktivierungsmarkern .....	31
3.1.8	Das konstitutive CD30 Signal führt zur Entstehung von erschöpften CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	34
3.1.9	Die Expression der Aktivierungsmarker ist ein direkter Effekt von LMP1/CD30 .....	35
3.2	Die Aktivierung von Signalwegen durch den konstitutiv aktiven CD30-Rezeptor in murinen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	37
3.2.1	Konstitutive CD30-Signale in T-Zellen führen durch Aktivierung des Akt-Signalweges zur Degradation von FoxO1 .....	38
3.2.2	Konstitutive CD30-Signale in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen führen zur Aktivierung der MAP-Kinasen Jnk und p38.....	41
3.3	Der Einfluss von konstitutiven CD30-Signalen auf die Differenzierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	44
3.3.1	Das konstitutive CD30-Signal fördert die Entstehung von T <sub>H</sub> 1-Zellen .....	44
3.3.2	Regulatorische T-Zellen sind in LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen vermehrt vorhanden .....	46
3.3.3	Konstitutive CD30-Signale verhindern die Entstehung von follikulären T-Helferzellen in den Peyerschen Plaques.....	46
3.3.4	Die Rolle des konstitutiven CD30-Signals in T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse während der T-Zell-abhängigen Immunantwort.....	47



3.4	LMP1/CD30 exprimierende T-Zellen haben einen Einfluss auf die B-Zellen .....	50
3.4.1	Die Antikörpertiter sind im Blut der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse stark vermindert.....	50
3.4.2	Der Einfluss des konstitutiven CD30-Signals in T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse auf die T-Zell-unabhängige Immunantwort.....	51
3.4.3	Veränderungen bei den Marginalzonen-B-Zell- und B1-Zellpopulationen in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen .....	52
3.4.4	B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zeigen in vitro keine Veränderungen hinsichtlich Aktivierung und Differenzierung.....	55
3.5	Der Phänotyp der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse lässt sich bei CD30//CD4Cre-Mäusen durch Immunisierung und Alterung teilweise induzieren.....	57
3.5.1	Die T-Zell-abhängige Immunisierung führt in CD30//CD4Cre-Mäusen zur verminderten Entstehung von follikulären T-Helferzellen und Keimzentren .....	57
3.5.2	Erhöhte Expression von Gedächtnis-T-Zell-Markern in gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen.....	59
3.5.3	Die aberrante Expression von CD30 auf T-Zellen gealterter Mäuse führt zur Expression von Aktivierungsmarkern .....	61
3.6	Führen deregulierte CD30 Signale in T-Zellen zur Tumorentstehung in gealterten Mäusen? .	62
3.6.1	Gealterte LMP1/CD30//CD4Cre- und CD30//CD4Cre Mäuse zeigen starke pathologische Auffälligkeiten .....	62
3.6.2	Die Expression von LMP1/CD30 und CD30 in T-Zellen führt in gealterten Mäusen zur Splenomegalie und erhöhten Zellzahlen in der Milz .....	63
3.6.3	In LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen sind in der Milz die T-Zellen expandiert und die B-Zellen reduziert .....	65
3.6.4	In den Milzen der gealterten CD30//CD30Cre-Mäuse sind CD4 <sup>+</sup> , sowie CD8 <sup>+</sup> T-Zellen expandiert.....	66
3.6.5	Die Struktur der Milzen gealterter, transgener Mäuse zeigt keine Anzeichen einer Tumorentstehung .....	68
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
4.1	Die Expression und Regulation des CD30-Rezeptors auf T-Zellen .....	70
4.2	CD30-Signale in T-Zellen führen zur Splenomegalie und erhöhten Zellzahlen in der Milz. .	72
4.3	Fördern CD30-Signale die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen? .....	73
4.4	CD30-Signale führen zur Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen .....	75
4.5	Konstitutive CD30-Signale führen zur Erschöpfung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	77
4.6	Der Einfluss von CD30-Signalen auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	78
4.6.1	Konstitutive CD30-Signale führen zur Aktivierung von Akt, Jnk und p38.....	78
4.6.2	Konstitutive CD30-Signale fördern die Differenzierung zur T <sub>H</sub> 1-Linie.....	79
4.6.3	Fördern konstitutive CD30-Signale die Bildung von FoxP3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen? .....	80
4.6.4	CD30-Signale inhibieren die Entwicklung von T <sub>FH</sub> -Zellen .....	81
4.7	LMP1/CD30-exprimierende T-Zellen haben einen Einfluss auf die B-Zellen .....	82
4.8	CD30-Signale in T-Zellen führen nicht zur Tumorentstehung .....	83
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>88</b>
7.1	Mausstämme .....	88
7.2	Oligonukleotide.....	89
7.3	Antikörper .....	89
7.4	Software .....	90
7.5	Geräte.....	91
<b>8</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>91</b>
8.1	Analyse von transgenen Mäusen.....	91
8.1.1	Maus-Verpaarungen.....	91
8.1.2	Präparation primärer Lymphozyten aus der Maus .....	92

8.1.3	Bestimmung der Zellzahlen .....	92
8.1.4	Isolierung reifer T- und B-Zellen aus der Milz .....	93
8.1.5	Immunisierung von Mäusen .....	93
8.1.5.1	T-Zell-abhängige Immunisierung der Mäuse .....	93
8.1.5.2	T-Zell-unabhängige Immunisierung der Mäuse .....	94
8.1.6	Präparation vom Blutserum aus Mäuseblut .....	94
8.1.7	Durchflusszytometrie .....	94
8.1.7.1	Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometer .....	94
8.1.7.2	Analyse von intrazellulären Proteinen mittels Durchflusszytometer .....	95
8.1.8	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	95
8.1.8.1	Bestimmung der allgemeinen Immunoglobulintiter im Serum .....	95
8.1.8.2	Bestimmung von NP-spezifischen Immunoglobulintiter im Serum .....	96
8.1.8.3	Bestimmung von löslichem CD30 im Serum .....	96
8.2	Zellkultur .....	97
8.2.1	Kultivierung von murinen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	97
8.2.1.1	Analyse der CD30-Expression .....	97
8.2.1.2	Kultivierung der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen zur Induktion von LMP1/CD30 .....	97
8.2.2	Stimulation der T-Zellen mit PMA und Ionomycin zur IFN- $\gamma$ Produktion .....	98
8.2.3	Kurzzeitstimulation der T-Zellen mit PMA und Ionomycin .....	98
8.2.4	Kultivierung von murinen B-Zellen .....	99
8.3	Immunhistochemie und Immunofluoreszenz .....	99
8.4	Molekularbiologische Methoden .....	100
8.4.1	DNA-assozierte Techniken .....	100
8.4.1.1	DNA Isolation aus Mausschwanzspitzen .....	100
8.4.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	100
8.4.1.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	101
8.4.2	Proteindetektion .....	101
8.4.2.1	Präparation von Proteinen aus primären Lymphozyten .....	101
8.4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	101
8.4.2.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	102
8.4.2.4	Western Blotting .....	102
8.4.2.5	Immundetektion .....	103
8.4.2.6	Quantifizierung der Western Blots .....	103
8.5	Statistik .....	103
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>118</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>119</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>120</b>
<b>13</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>14</b>	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>121</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der weißen Pulpa in Mäusen. ....	4
Abbildung 2: Entstehung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen. ....	6
Abbildung 3: Verschiedene Stadien und Orte der T <sub>FH</sub> -Zell-Differenzierung. ....	9
Abbildung 4: Interaktion zwischen T <sub>FH</sub> - und B-Zellen. ....	11
Abbildung 5: Verschiedene Modelle zur Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen. ....	15
Abbildung 6: Darstellung des rekombinanten <i>rosa26</i> -Lokus der LMP1/CD30 <sup>flSTOP</sup> Mauslinie. ....	19
Abbildung 7: Darstellung des rekombinanten <i>rosa26</i> -Lokus der CD30 <sup>flSTOP</sup> Mauslinie. ....	19
Abbildung 8: Das Reportergen hCD2 wird in den T-Zellen der transgenen Mäuse exprimiert. ....	21
Abbildung 9: Die T-Zellen der transgenen Mäuse exprimieren LMP1/CD30 bzw. CD30. ....	22
Abbildung 10: CD30-Expression auf stimulierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in vitro. ....	23
Abbildung 11: Lösliches CD30 ist im Serum von CD30//CD4Cre-Mäusen nachweisbar. ....	24
Abbildung 12: Die T-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 bzw. CD30 führt zur Splenomegalie und erhöhten Gesamtzellzahlen in der Milz. ....	25
Abbildung 13: Die T-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 bzw. CD30 führt zu erhöhten B- und T-Zellzahlen in der Milz. ....	26
Abbildung 14: Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse weisen keine strikte Trennung von T- und B-Zellen auf. ....	27
Abbildung 15: Prozentuale Verteilung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Lymphknoten. ....	28
Abbildung 16: Vergleich der absoluten Zellzahlen von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in der Milz. ....	29
Abbildung 17: Vergleich der prozentualen Anteile der T-Zellen im Thymus. ....	29
Abbildung 18: Verteilung von Gedächtnis-T-Zellen und naiven T-Zellen in der Milz. ....	31
Abbildung 19: T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse wiesen eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern auf. ....	32
Abbildung 20: Das konstitutive CD30-Signal führt in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen zur Expression typischer „Erschöpfungs“-Marker. ....	34
Abbildung 21: Das Reportermolekül hCD2 wird auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4CreER <sup>T2</sup> -Mäuse nach Zugabe von Tamoxifen exprimiert. ....	36
Abbildung 22: Die Induktion konstitutiver CD30-Signale in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen führt zur verstärkten Expression von CD69, CD44, PD-1 und CD95. ....	37
Abbildung 23: Konstitutive CD30-Signale führen zur Degradation von FoxO1. ....	38
Abbildung 24: Vereinfachtes Schema der Regulation von FoxO1 durch Akt. ....	39
Abbildung 25: LMP1/CD30 exprimierende CD4 <sup>+</sup> T-Zellen zeigen erhöhte pAkt Level. ....	39
Abbildung 26: Die Stimulation von LMP1/CD30-exprimierenden CD4 <sup>+</sup> T-Zellen führt zu verstärkter Phosphorylierung von Akt. ....	40
Abbildung 27: Erhöhte Level von pp38 und pJnk in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse. ....	42
Abbildung 28: Die Aktivität der MAP-Kinasen wird nach Stimulation der CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch CD30-Signale nicht zusätzlich erhöht. ....	43
Abbildung 29: Expression von TIM-1 und TIM-3 auf CD4 <sup>+</sup> T-Zellen von Kontroll- und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen. ....	44
Abbildung 30: Das konstitutive CD30-Signal fördert die Entstehung von IFN- $\gamma$ produzierenden CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....	45
Abbildung 31: Erhöhte prozentuale Anteile von Foxp3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse. ....	46
Abbildung 32: Durch das Fehlen von T <sub>FH</sub> -Zellen in den Peyerschen Plaques der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse ist keine Keimzentrumsreaktion möglich. ....	47
Abbildung 33: Nach Immunisierung der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse mit einem T-Zell-abhängigen Antigen können keine T <sub>FH</sub> -Zellen in der Milz nachgewiesen werden. ....	48
Abbildung 34: LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse bilden nach T-Zell-abhängiger Immunisierung keine Keimzentren aus. ....	49
Abbildung 35: Seren von LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen weisen nach T-Zell-abhängiger Immunisierung keine Antigen-spezifischen IgM- und IgG1-Titer auf. ....	50
Abbildung 36: Stark erniedrigte Titer verschiedener Immunglobulin-Isotypen im Serum von LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen. ....	51

Abbildung 37: Nach T-Zell-unabhängiger Immunisierung sind in Seren der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse die Antigen-spezifischen IgM- und IgG3-Titer stark reduziert.....	52
Abbildung 38: LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse weisen Veränderungen in den Marginalzonen-B-Zell- und der folliculären B-Zellpopulation auf. ....	53
Abbildung 39: Stark verminderte Anteile von B1-Zellen im Bauchraum der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse.....	54
Abbildung 40: Die B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse exprimieren kein hCD2. ....	54
Abbildung 41: B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zeigen ex vivo und in vitro den gleichen Aktivierungsstatus wie Kontroll-B-Zellen.....	56
Abbildung 42: B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse differenzieren in vitro zu Plasmazellen. ...	56
Abbildung 43: CD30//CD4Cre-Mäuse weisen nach T-Zell-abhängiger Immunisierung geringere prozentuale Anteile von T <sub>FH</sub> -Zellen auf.....	58
Abbildung 44: Verminderte Bildung von Keimzentren nach T-Zell-abhängiger Immunisierung in den CD30//CD4Cre Mäusen.....	59
Abbildung 45: Verteilung von Gedächtnis T-Zellen und naiven T-Zellen in der Milz von älteren Mäusen.....	60
Abbildung 46: Erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen gealterter CD30//CD4Cre-Mäuse. ....	61
Abbildung 47: LMP1/CD30//CD4Cre- und CD30//CD4Cre-Mäuse erkranken nach einigen Monaten..	63
Abbildung 48: Vergleich der Milzgrößen und Milzgewichte in gealterten Mäusen. ....	64
Abbildung 49: Vergleich der Gesamtzellzahlen der Milzen von gealterten und jungen Mäusen. ....	64
Abbildung 50: Vergleich der B- und T-Zellzahlen in Milzen von gealterten und jungen Mäusen.....	65
Abbildung 51: Vergleich der CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellzahlen in Milzen von jungen und gealterten Mäusen.....	67
Abbildung 52: Follikelstrukturen von Milzen gealterter Mäuse. ....	68

### III. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti
AIRE	Autoimmun-Regulator
ALCL	Anaplastisch großzelliges Lymphom ( <i>anaplastic large cell lymphoma</i> )
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
Bcl-6	<i>B-cell lymphoma 6</i>
Blimp-1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
BSA	Rinder-Serum Albumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
C	<i>Constant</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CAGGs-Promotor	<i>CMV early enhancer/chicken <math>\beta</math>-actin/ rabbit globulin promoter</i>
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD30-L	CD30-Ligand
CD40-L	CD40-Ligand
CGG	<i>Chicken gamma globulin</i>
Cre	Protein-Rekombinase vom Phagen P1
CTL	Cytotoxische T-Zelle
CXCL	CXC Chemokin Ligand
CXCR	CXC Chemokin Rezeptor
D	<i>Diversity</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modification of the eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelt-negativ
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DP	Doppelt-positiv
DZ	dendritische Zelle
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
et al.	Und andere (et alii)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
fDZ	Follikuläre dendritische Zellen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FoB	follikuläre B-Zelle
FoxO1	<i>Forkhead box O1</i>
FoxP3	<i>Forkhead box protein P3</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
hCD2	Humanes CD2
HEPES	4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus

HRP	Meerrettich Peroxidase
ICOS	<i>Inducible T-cell costimulator</i>
ICOS-L	ICOS-Ligand
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
J	<i>Joining</i>
Jnk	c-Jun N-terminale Kinase
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Kaliumaluminiumsulfat
kDa	Kilodalton
KLRG-1	<i>Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>
L	Liter
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>
LMP	Latentes Membran-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
loxP	<i>Locus of crossing over, x</i>
M	Molar
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MOMA	Monozyten, Makrophagen
MZ	Marginalzone
MZB	Marginalzonen-B-Zellen
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NP	Nitrophenylacetyl
NP40	Nonoxinol 40
n.s.	Nicht signifikant
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PD-1-L	PD-1-Ligand
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perdinin-Chlorophyll-Protein
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PMA	<i>Phorbol myristat acetat</i>
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
sec	<i>second</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>

T <sub>CM</sub>	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TE	Tris-EDTA
T <sub>EM</sub>	Effektor Gedächtnis-T-Zelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen Diamin
T <sub>FH</sub> -Zelle	follikuläre T-Helfer-Zelle
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TIM	<i>T cell immunoglobulin mucin</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNF-R	Tumor-Nekrose Faktor-Rezeptor
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
T <sub>RM</sub>	<i>Tissue-resident memory T cell</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>Unit</i>
u. a.	Unter anderem
V	Volt
WB	<i>Western-Blot</i>
v/v	<i>Volume per volume</i>
w/v	<i>Weight per volume</i>
x	Mal
z. B.	Zum Beispiel

Begriffe aus dem Englischen wurden durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Während des Lebens ist der Organismus einer Vielzahl von Krankheitserregern ausgesetzt. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, um Pathogene zu bekämpfen. Im Gegensatz zu Pflanzen und Invertebraten, die nur ein angeborenes Immunsystem besitzen, verfügen Wirbeltiere zusätzlich über ein adaptives Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem reagiert sehr schnell, aber unspezifisch auf Pathogene und fremde Strukturen. Das adaptive Immunsystem richtet sich sehr spezifisch gegen Pathogene, aber auch gegen körpereigene entartete Zellen und hat die Fähigkeit ein immunologisches Gedächtnis auszubilden.

Die Zellen der angeborenen, wie auch der adaptiven Immunantwort entwickeln sich bei Säugern aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Aus diesen pluripotenten Zellen entstehen zwei verschiedene Zelltypen. Zum einen entwickeln sich diese in myeloide Vorläuferzellen, aus denen Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und dendritische Zellen entstehen, welche Teil des angeborenen Immunsystems sind. Zum anderen entstehen lymphatische Vorläuferzellen, aus denen sich B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) entwickeln. B- und T-Zellen sind für die adaptive Immunantwort verantwortlich, welche in die humorale und in die zelluläre Immunantwort unterteilt wird. Die humorale Immunantwort wird durch B-Zellen vermittelt, Antigen-aktivierte B-Zellen sezernieren Antikörper, die spezifisch fremde Strukturen erkennen und so eliminieren können. Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Zellen vermittelt und beseitigt intrazelluläre Pathogene, Viren oder entartete Zellen (Janeway et al., 2014).

## 1.2 Die T-Zellentwicklung im Thymus

T-Zellen entwickeln sich aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Einige dieser Vorläuferzellen verlassen das Knochenmark und wandern über das Blut in den Thymus, wo sie sich zu reifen T-Zellen entwickeln. Der Thymus lässt sich in vier große Bereiche unterteilen: Den Cortex (Rinde), den subkapsulären Bereich am äußeren Cortextrand, die Medulla (Mark) und den corticomedullären Bereich zwischen Cortex und Medulla. Über das Blut gelangen die Vorläuferzellen in den corticomedullären Bereich. Dort erhalten sie von den Stromazellen des Thymus Signale über den Notch-Rezeptor, was dazu führt, dass die



Vorläuferzellen ihr Potential zu B-Zellen oder NK-Zellen differenzieren zu können verlieren und sich zu doppelt-negativen Thymozyten entwickeln. Diese Zellen exprimieren noch nicht die charakteristischen Marker reifer T-Zellen, wie CD3 oder den T-Zell-Rezeptor (TZR). Auch die Korezeptoren CD4 oder CD8 werden in diesem Entwicklungsstadium noch nicht exprimiert, daher werden sie als doppelt-negative (DN) Thymozyten bezeichnet. Doppelt-negative Thymozyten durchlaufen vier Entwicklungsstadien, bis sie schließlich eine reife funktionale  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors exprimieren (Koch und Radtke, 2011; von Boehmer, 2014). Der reife T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, einer  $\alpha$ -Kette (TZR- $\alpha$ ) und einer  $\beta$ -Kette (TZR- $\beta$ ), die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Clambey et al., 2014). Bei einer kleinen T-Zellpopulation besteht der T-Zell-Rezeptor jedoch aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette (Zarin et al., 2015). In diesem Kapitel wird jedoch nur auf die Entstehung von konventionellen T-Zellen mit einem  $\alpha$ : $\beta$ -T-Zell-Rezeptor eingegangen. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des TZR bestehen aus einer variablen (V) und einer konstanten (C) Domäne. Die variable Domäne des TZR- $\alpha$  setzt sich aus V und J (*joining*) Gensegmenten, die des TZR- $\beta$  aus V, J und D (*diversity*) Gensegmenten zusammen. Im Laufe der T-Zellentwicklung findet eine Umlagerung dieser Segmente mit Hilfe genetischer Rekombination statt, um eine möglichst hohe Diversität des TZR zu gewährleisten (Market und Papavasiliou, 2003; von Boehmer, 2014).

Das erste Entwicklungsstadium der doppelt-negativen Thymozyten wird als DN1 bezeichnet. Die DN1-Thymozyten, welche sich noch im corticomedullären Bereich befinden, beginnen stark zu proliferieren. Anhaltende Signale über den Notch-Rezeptor halten den Entwicklungsweg zur T-Zell-Differenzierungsreihe aufrecht. In diesem Stadium findet noch keine Genumlagerung der Ketten für den T-Zell-Rezeptor statt. Anschließend wandern die Thymozyten in den Cortex und entwickeln sich zu DN2-Thymozyten, in denen die D-J Segmente der TZR- $\beta$ -Kette umgelagert werden. Die folgenden Entwicklungsstadien DN3 und DN4 finden im subkapsulären Bereich am äußeren Cortexrand statt. Im DN3-Stadium findet die V-DJ Umlagerung der TZR- $\beta$ -Kette statt. Im Zuge der  $\beta$ -Selektion verbindet sich die nun exprimierte  $\beta$ -Kette mit einer prä- $\alpha$ -Kette und dem ebenfalls gebildeten CD3 Rezeptor zu einem prä-TZR Komplex. Ist eine produktive Umlagerung der  $\beta$ -Ketten erfolgt, kann eine Signalweiterleitung durch den prä-TZR Komplex stattfinden, die Zellen erhalten Überlebenssignale und differenzieren zu DN4-Zellen. In diesem Entwicklungsstadium wandern die Thymozyten aus dem subkapsulären Bereich in den Cortex. Die Signale, die durch den prä-TZR Komplex vermittelt werden, führen zur Expression der Korezeptoren CD4

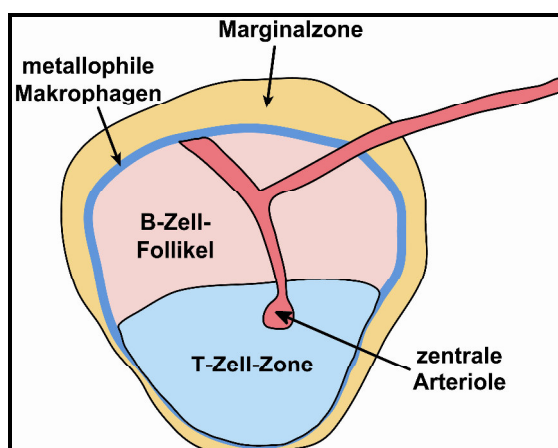
und CD8, so dass die Thymozyten schließlich als doppelt-positive Thymozyten (DP) bezeichnet werden (Koch und Radtke, 2011; von Boehmer, 2014).

Bei DP-Thymozyten erfolgt die Umlagerung der  $\alpha$ -Kette des T-Zell-Rezeptors. Geringe Mengen des reifen TZR werden an der Zelloberfläche exprimiert. Im Zuge der positiven Selektion wird sichergestellt, dass die T-Zell-Rezeptoren ein adäquates Bindungsvermögen an MHC (*major histocompatibility complex*) Moleküle der Klasse I oder Klasse II besitzen. Im Thymus lokalisierte Epithelzellen, dendritische Zellen und Fibroblasten präsentieren über MHC-Moleküle körpereigene Peptide. Geht der gebildete T-Zell-Rezeptor keine oder eine zu starke Bindung mit den selbst-Peptid:selbst-MHC-Komplexen ein, erfolgt die Apoptose der DP-Thymozyten. Die Bindung an MHC Klasse II Molekülen führt zur Entstehung von einfach-positiven  $CD4^+$  T-Zellen ( $CD4^+$ ,  $CD8^-$ ), die Bindung an MHC Klasse I Molekülen zur Bildung von einfach-positiven  $CD8^+$  T-Zellen ( $CD8^+$   $CD4^-$ ) (Egawa, 2015; Germain, 2002). Doppelt-positive T-Zellen sind ebenfalls Vorläufer einer kleinen Subpopulation von T-Zellen, den NKT-Zellen (natürliche Killer T-Zellen). Hier findet, im Gegensatz zu den konventionellen T-Zellen, die Selektion nicht durch MHC-Moleküle, sondern durch CD1d-Moleküle statt (Buechel et al., 2015; Gapin et al., 2013). Nur ca. 10 % der T-Zellen überstehen die positive Selektion, sie reifen heran und exprimieren große Mengen des TZR. Thymozyten, die erfolgreich die positive Selektion durchlaufen haben, wandern als einfach-positive Zellen in die Medulla. Hier findet die „negative Selektion“ statt, die nur ca. 2 % der Thymozyten überleben. Medulläre Thymus-Epithelzellen exprimieren über MHC I- oder MHC II-Komplexe viele verschiedene gewebespezifische Autoantigene. Für die Expression dieser Autoantigene ist der Transkriptionsfaktor AIRE (Autoimmun-Regulator) von Nöten, welcher ebenfalls von den medullären Thymus-Epithelzellen exprimiert wird. Geht der T-Zell-Rezeptor eine starke Bindung mit den selbst-Peptid:MHC-Komplexen ein, führt dies zur Apoptose der T-Zellen. So wird die Entstehung von autoreaktiven T-Zellen verhindert. Die reifen T-Zellen verlassen nun den Thymus und wandern in die peripheren lymphatischen Organe ein (Anderson und Su, 2011; Ucar und Rattay, 2015).

## 1.3 Aktivierung von T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen

### 1.3.1 Die Struktur der Milz

Die Aktivierung der T-Zellen findet in den sekundären lymphatischen Organen statt. Hierzu zählen die Lymphknoten, die Peyerschen Plaques und die Milz. Über das Blut gelangen die reifen naiven T-Zellen in die Milz, während sie über die Lymphgefäße die Lymphknoten erreichen. Die Struktur der Milz lässt sich in zwei Kompartimente, die rote und die weiße Pulpa, einteilen: In der roten Pulpa wird Blut gefiltert und alte Erythrozyten werden entfernt, in der weißen Pulpa, dem lymphatischen Gewebe der Milz, findet die adaptive Immunantwort statt (Mebius und Kraal, 2005). Die Organisation von T- und B-Zellen in der weißen Pulpa ähnelt dem Aufbau anderer lymphatischer Organe (den Haan et al., 2012). Die weiße Pulpa der Milz lässt sich in primäre Follikel, in denen follikuläre B-Zellen lokalisiert sind, und in die T-Zell-Zone (periarteriöläre lymphatische Scheide), wo sich T-Zellen und dendritische Zellen befinden, einteilen. In der T-Zell-Zone findet die Interaktion von dendritischen Zellen mit den T-Zellen statt. Die Grenze zwischen roter und weißer Pulpa bildet die Marginalzone (MZ). Über den Marginalsinus gelangt Blut in das vaskuläre System der Marginalzone, die Zellen der MZ können somit sehr schnell auf Pathogene aus dem Blut reagieren. In der MZ befinden sich hauptsächlich Marginalzonen-B-Zellen (MZB) und Marginalzonen-Makrophagen. Zusätzlich wird der Marginalsinus von metallophilen Makrophagen umgeben (Pillai et al., 2005). Eine schematische Übersicht der weißen Pulpa von Mäusen liefert Abbildung 1.



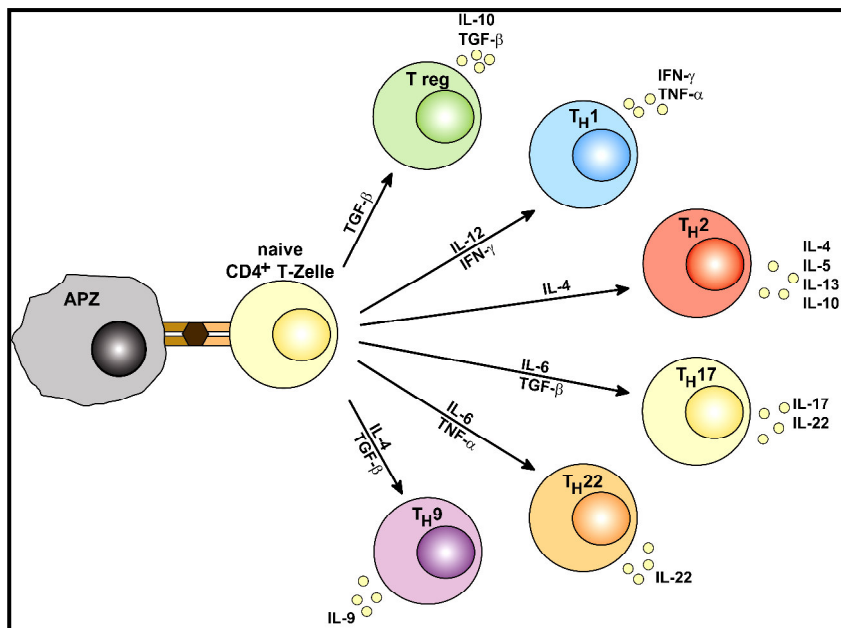
**Abbildung 1: Aufbau der weißen Pulpa in Mäusen.** Über die zentrale Arteriole gelangen die Lymphozyten in die weiße Pulpa, welche von der Marginalzone (MZ) umgeben wird. Metallophile Makrophagen sind am inneren Rand der MZ lokalisiert. B- und T-Zellen befinden sich in separaten Bereichen, den B-Zell-Follikeln und der T-Zell-Zone. Dendritische Zellen sind ebenfalls in der T-Zell-Zone lokalisiert.

### 1.3.2 Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Trifft eine naive T-Zelle auf ein für ihren Rezeptor spezifisches Antigen, welches von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) in sekundären lymphatischen Organen in Form von Peptid:MHC-Komplexen präsentiert wird, findet eine Aktivierung der T-Zellen statt. T-Zellen, die nicht aktiviert werden, verlassen über das Blut das Lymphgewebe und pendeln zwischen Blut und peripheren Lymphgewebe solange hin und her, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Für die Aktivierung der T-Zellen sind drei Signale nötig. Die Stimulierung des T-Zell-Rezeptors (TZR) durch Bindung an Peptid:MHC-Komplexe (**Signal 1**) löst die erste Aktivierung aus (Smith-Garvin et al., 2009). Die Korezeptoren CD4 und CD8 sind für die Stabilisierung der TZR::Peptid:MHC-Komplexe verantwortlich. Die Korezeptoren assoziieren mit dem TZR und binden zusätzlich an die MHC-Moleküle, wobei der Korezeptor CD4 nur an MHC-II-Moleküle, der Korezeptor CD8 nur an MHC-I-Molekülen bindet (Gao et al., 2002). Jedoch ist die Bindung des TZR und der Korezeptoren CD4 und CD8 an die Peptid:MHC-Komplexe für eine volle Aktivierung nicht ausreichend. Fehlen weitere kostimulatorische Signale führt dies zur Anergie der T-Zellen. Diese kostimulatorischen Signale werden über kostimulatorische Rezeptoren, wie z. B. CD28 vermittelt, die nach Aktivierung der T-Zellen von diesen exprimiert werden (Smith-Garvin et al., 2009). Die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen für die Aktivierung von naiven T-Zellen sind dendritische Zellen. Diese exprimieren nach Reifung durch Kontakt mit Pathogenen eine Vielzahl von kostimulatorischen Molekülen, wie z. B. CD80 und CD86 und wandern verstärkt in sekundäre lymphathische Gewebe ein (Koorella et al., 2014; Steinman, 1991). Bindet der CD28-Rezeptor auf den T-Zellen an CD80 oder CD86 auf den dendritischen Zellen (**Signal 2**) wird das Signal des TZR amplifiziert und die T-Zellen gehen mit den dendritischen Zellen stabile, lang anhaltende Kontakte ein, die zur vollen Aktivierung führen (Zheng et al., 2008). Unreife dendritische Zellen gehen nur kurze, instabile Kontakte mit den T-Zellen ein und induzieren eine abortive Proliferation der T-Zellen (Hernandez et al., 2001). Wechselwirkungen mit akzessorischen Molekülen auf den antigenpräsentierenden Zellen stabilisieren die Interaktion zwischen den beiden Zelltypen (Femke Broere et al., 2011). Der Einfluss unterschiedlicher Zytokine auf die aktivierte T-Zelle (**Signal 3**) steuert die Differenzierung in die unterschiedlichen Effektor-T-Zellpopulationen. Ein Teil der T-Zellen differenziert zu langlebigen Gedächtnis-T-Zellen (Siehe Kapitel 1.3.4) (Pennock et al., 2013).

### 1.3.2.1 Die Differenzierung zu CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen

CD4<sup>+</sup> T-Zellen können unterschiedliche Differenzierungswege einschlagen, die verschiedene immunologische Aufgaben besitzen. Abhängig vom Zytokinmilieu (Signal 3) während der T-Zellaktivierung, können CD4<sup>+</sup> T-Zellen in unterschiedliche Gruppen von T-Helferzellen differenzieren. Die heute bekannten Untergruppen umfassen T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>9, T<sub>H</sub>22 und regulatorische T-Zellen (Treg) (Ivanova und Orekhov, 2015; Zhu et al., 2010). Eine Übersicht über die unterschiedlichen Subpopulationen ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Entstehung von CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen.**

Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen können nach Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen unter Einfluss bestimmter Zytokine zu T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17, T<sub>H</sub>9, T<sub>H</sub>22 oder Treg differenzieren. Diese Subpopulationen sekretieren verschiedene Zytokine und führen während der adaptiven Immunantwort unterschiedliche Funktionen aus. APZ = antigenpräsentierende Zelle, Treg = regulatorische T-Zelle; Adaptiert aus Jiang und Dong, 2013.

**T<sub>H</sub>1-Zellen** spielen hauptsächlich eine Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen und sind bei der Aktivierung von Makrophagen und der Entstehung von Entzündungsreaktionen von Bedeutung. Erkennen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen, dendritische Zellen oder Makrophagen, bestimmte Pathogene, werden sie zur Produktion von IFN- $\gamma$  angeregt. Dendritische Zellen und Makrophagen produzieren zusätzlich noch IL-12 (Interleukin 12) (Martinez und Gordon, 2014). In Anwesenheit von IL-12 und IFN- $\gamma$  differenzieren naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen und exprimieren den für sie spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet. Die aktivierten T<sub>H</sub>1-Zellen beginnen mit der Produktion von IL-2, IL-13, GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) und großen Mengen der inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Caza und Landas, 2015; Jiang und Dong, 2013). Dies führt zur Aktivierung und Proliferation von Makrophagen und weiteren Effektorzellen, infolgedessen kommt es zu einer Entzündungsreaktion. Für die

zellvermittelte Abwehr des adaptiven Immunsystems sind somit größtenteils  $T_H1$ -Zellen und durch  $T_H1$ -Zellen aktivierte Makrophagen verantwortlich (Martinez und Gordon, 2014).

**$T_H2$ -Zellen** sind für die Bekämpfung von extrazellulären Parasiten und Würmern von Bedeutung, und spielen außerdem bei der Entstehung von Allergien eine Rolle. Makrophagen, Marginalzonen-B-Zellen und NKT-Zellen sezernieren bei Kontakt mit bestimmten Pathogenen IL-4, das für die Differenzierung zu  $T_H2$ -Zellen nötig ist (Swain et al., 1990; Zietara et al., 2011).  $T_H2$ -Zellen, für die der Transkriptionsfaktor GATA-3 charakteristisch ist, sezernieren hauptsächlich IL-4, IL-5 und IL-13, aber auch IL-10, welches die Zytokinproduktion von  $T_H1$ -Zellen hemmt und die Entstehung von  $T_H2$ -Zellen begünstigt (Caza und Landas, 2015; Jiang und Dong, 2013).  $T_H2$ -Zytokine aktivieren Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten, die für die Eliminierung von extrazellulären Parasiten wichtig sind. Die  $T_H2$ -Zytokine IL-4 und IL-5 sind zudem für die Aktivierung von B-Zellen und die damit verbundene Produktion löslicher Antikörper verantwortlich.  $T_H2$ -Zellen sind somit maßgeblich an der über lösliche Antikörper im Blut vermittelten Immunantwort beteiligt, welche als „humorale Immunantwort“ bezeichnet wird (Pennock et al., 2013).

**$T_H17$ -Zellen** sind hauptsächlich bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten, aber auch bei Entzündungsreaktionen und Immunität gegen extrazelluläre Pathogene von Bedeutung. Diese T-Zellsubpopulation wurde erst im Jahre 2006 entdeckt und benötigt zur Differenzierung die Zytokine IL-6 und TGF- $\beta$ . Charakteristisch für diesen Zelltyp ist der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t und die Sekretion von IL-17 und IL-22 (Ivanov et al., 2006; Kim und Jordan, 2013; Patel und Kuchroo, 2015; Veldhoen et al., 2006).

Vor einigen Jahren wurden zwei weitere T-Helferzelltypen beschrieben.  **$T_H22$ -Zellen**, die durch die Sekretion von IL-22 charakterisiert sind, spielen bei entzündlichen chronischen Hautkrankheiten und Allergien eine Rolle (Eyerich und Eyerich, 2015; Eyerich et al., 2009).

**$T_H9$ -Zellen** produzieren IL-9 und haben Einfluss auf die Entstehung von Asthma und Autoimmunkrankheiten (Kaplan, 2013; Veldhoen et al., 2008).

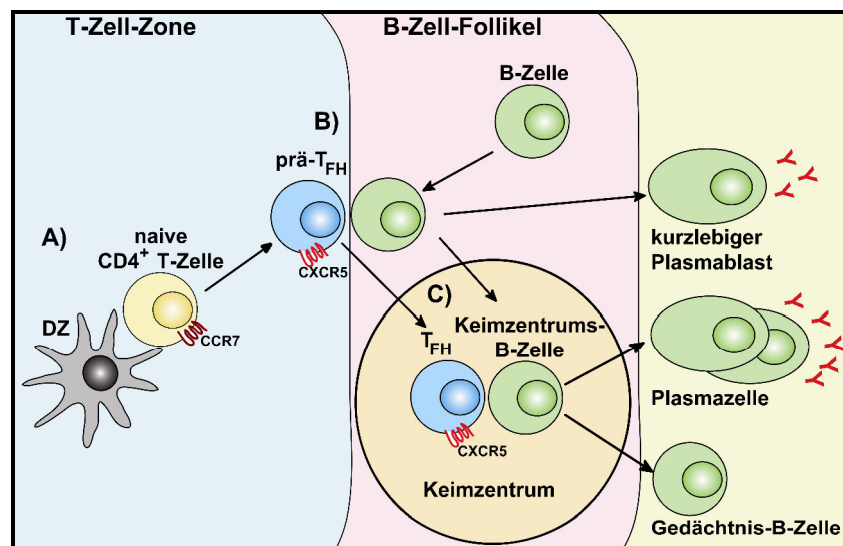
Im Gegensatz zu den andern Typen von T-Helferzellen, haben **regulatorische T-Zellen (Treg)** einen suppressiven Einfluss auf das Immunsystem. Sie spielen bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und bei der Prävention von Autoimmunkrankheiten eine wichtige Rolle. Diese, meist  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen, sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert (Kaufman et al., 2015; Sakaguchi et al., 2008). Es wurde jedoch auch eine Population von  $CD4^+CD25^-FoxP3^+$  Treg beschrieben, deren Funktion und Entstehung noch nicht genau bekannt ist (Nie et al., 2015; Zelenay et al., 2005).

### 1.3.2.2 Die Differenzierung von follikulären T-Helferzellen und deren Funktion bei der Entstehung von Keimzentren während der T-Zell-abhängigen Immunantwort

Eine weitere Subpopulation von  $CD4^+$  T-Zellen stellen die **follikulären T-Helferzellen ( $T_{FH}$ )** dar, die durch die Expression des Transkriptionsfaktors Bcl-6 charakterisiert sind. Die Bcl-6-Expression wird durch die Interaktion von dendritischen Zellen mit aktivierten T-Zellen induziert. Bcl-6 führt zur Expression des Oberflächenmarkers CXCR5, ein weiteres Charakteristikum für  $T_{FH}$ -Zellen. Andere aktivierte  $CD4^+$  Helfer-T-Zellen exprimieren hohe Spiegel des Transkriptionsfaktors Blimp-1, welcher ein Antagonist von Bcl-6 ist und somit die Differenzierung zu  $T_{FH}$ -Zellen verhindert. Dies führt zur Annahme, dass aus naiven  $CD4^+$  T-Zellen entweder  $Bcl-6^+ T_{FH}$ -Zellen oder  $Blimp-1^+$  nicht- $T_{FH}$ -Zellen entstehen, welche sich in die bereits beschriebenen Untergruppen  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ ,  $T_H9$ ,  $T_H22$  oder Tregs einteilen lassen (Choi et al., 2011; Crotty, 2014; Liu et al., 2013).

$T_{FH}$ -Zellen sind für die Ausbildung von Keimzentren essentiell. Naive B-Zellen produzieren nach Aktivierung nieder-affine Antikörper oder sie differenzieren zu Keimzentrums-B-Zellen. Aus Keimzentrums-B-Zellen können sich Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen, welche hoch-affine Antikörper sezernieren, entwickeln. Keimzentren bilden sich im Rahmen einer Infektion mit T-Zell-abhängigen Antigenen. Sie sind aber auch in den Peyerschen Plaques vorhanden, da hier permanente Immunreaktionen gegen die im Darm vorhandenen Bakterien ablaufen (De Silva und Klein, 2015; Victora und Nussenzweig, 2012). Die Entwicklung der  $T_{FH}$ -Zellen beginnt in der T-Zell-Zone. Durch Erkennen eines MHCII:Peptidkomplexes auf antigenpräsentierenden Zellen, wird die naive  $CD4^+$  T-Zelle aktiviert. Abhängig vom Zytokinmilieu werden durch die APZ Signale an die  $CD4^+$  T-Zelle vermittelt, die zur Expression des Transkriptionsfaktors Bcl-6, des Chemokinrezeptors CXCR5 und zum Verlust des Oberflächenmoleküls CCR7 führen (Abb. 3A) (Crotty, 2014; Ma et al., 2012). Parallel dazu werden B-Zellen durch das Antigen aktiviert. B-Zellen erkennen Antigene mit Hilfe des B-Zell-Rezeptors (BZR). Nach Bindung des Antigens an den BZR wird dieses internalisiert und nach dessen Prozessierung von MHC Klasse II Molekülen auf der Oberfläche der B-Zellen präsentiert. Der erste Kontakt zwischen B-Zellen und  $T_{FH}$ -Zellen findet an der Grenze zwischen B- und T-Zell-Zone statt. Das Verschwinden von CCR7 auf der Oberfläche, sowie die Expression von CXCR5, erlaubt es der  $T_{FH}$ -Zelle in diesen Bereich zu migrieren. Die  $T_{FH}$ -Zelle ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausdifferenziert (prä- $T_{FH}$ -Zelle), für den weiteren Entwicklungsschritt ist der Kontakt zu B-Zellen nötig (Abb. 3B) (Linterman und Vinuesa, 2010; Suh, 2015). Nach Wanderung der B-Zellen an die Grenze zwischen B- und T-Zell-Zone wird der Peptid:MHCII-Komplex auf der Oberfläche der B-Zellen von den

für dieses Peptid spezifischen TZR auf prä-T<sub>FH</sub>-Zellen erkannt. (Okada et al., 2005; Suh, 2015). Dies führt bei B-Zellen zur Expression von Aktivierungsproteinen wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die mit dem kostimulatorischen Molekül CD28 auf der T-Zelle interagieren. Die prä-T<sub>FH</sub>-Zellen erhalten dadurch ihr zweites Aktivierungssignal. Für die weitere Entwicklung der prä-T<sub>FH</sub>-Zellen sind zusätzliche Interaktionen mit Molekülen auf den B-Zellen notwendig, wie beispielsweise die Interaktion von CD40 auf B-Zellen mit dem CD40-Liganden (CD40-L) auf den prä-T<sub>FH</sub>-Zellen. Von essentieller Bedeutung ist zudem die Stimulierung des ICOS-Rezeptors (Crotty, 2014; Suh, 2015). Aktivierte prä-T<sub>FH</sub>-Zellen exprimieren den ICOS-Rezeptor (*inducible T cell costimulator*), welcher mit dem ICOS-Liganden (ICOS-L) auf den aktivierten B-Zellen interagiert. In ICOS<sup>-/-</sup>, oder ICOS-L<sup>-/-</sup> Mäusen ist keine Entwicklung von T<sub>FH</sub>-Zellen möglich (Crotty, 2014; Nurieva et al., 2008). Durch die Interaktion mit der prä-T<sub>FH</sub>-Zelle entwickeln sich aus den B-Zellen entweder extrafollikuläre, kurzlebige Plasmablasten, die nieder-affine Antikörper sezernieren, oder die B-Zellen beginnen zu proliferieren und ein Keimzentrum zu formen (Abb. 3B und C) (Ma et al., 2012; Suh, 2015). Im Keimzentrum befinden sich follikuläre dendritische Zellen, welche das Chemokin CXCL13 sekretieren. Dieses Chemokin lockt CXCR5-exprimierende prä-T<sub>FH</sub>-Zellen in das Keimzentrum, wo sie sich zu reifen T<sub>FH</sub>-Zellen entwickeln (Abb. 3C) (Allen und Cyster, 2008; Crotty, 2014).



**Abbildung 3: Verschiedene Stadien und Orte der T<sub>FH</sub>-Zell-Differenzierung.**

A) Die Aktivierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch dendritische Zellen findet in der T-Zell-Zone statt. Die von den dendritischen Zellen vermittelten kostimulatorischen Signale führen zur Differenzierung in prä-T<sub>FH</sub>-Zellen, was zur Expression von CXCR5 und zum Verlust von CCR7 führt. B) An der Grenze zwischen B- und T-Zell-Zone findet die Interaktion mit aktivierten, antigenpräsentierenden B-Zellen statt. Nach Kontakt mit der prä-T<sub>FH</sub>-Zelle können B-Zellen entweder zu kurzlebigen, extrafollikulären Plasmablasten, oder zu Keimzentrums-B-Zellen differenzieren. C) Prä-T<sub>FH</sub> Zellen wandern in das Keimzentrum, wo sie zu T<sub>FH</sub>-Zellen reifen. B-Zellen, die das Keimzentrum verlassen, entwickeln sich entweder zu langlebigen Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen. T<sub>FH</sub> = follikuläre T-Helferzelle, DZ=dendritische Zelle. Modifiziert nach Ma et al., 2012.



In Mäusen bestehen Keimzentren aus zwei verschiedenen Zonen, der dunklen Zone und der hellen Zone. In der dunklen Zone befinden sich stark proliferierende B-Zellen, welche als Zentroblasten bezeichnet werden. In der hellen Zone sind kleine, nicht-proliferierende B-Zellen, auch Zentrozyten genannt, sowie follikuläre dendritische Zellen und T<sub>FH</sub>-Zellen zu finden. Die Interaktion zwischen T<sub>FH</sub>-Zellen und Keimzentrums-B-Zellen findet ausschließlich in der hellen Zone statt (De Silva und Klein, 2015; Victora und Nussenzweig, 2012) und ist für die Selektion der Keimzentrums-B-Zellen wichtig. Die Zentroblasten in der dunklen Zone unterliegen einer massiven klonalen Expansion, in diesem proliferativen Stadium findet die somatische Hypermutation statt, die zur Erhöhung oder Erniedrigung der Antigenspezifität des BZR führt. Die B-Zellen wandern aus der dunklen in die helle Zone, wo follikuläre dendritische Zellen (fDZ) den Zentrozyten auf ihrer Oberfläche gebundene Antigene präsentieren. Zentrozyten, deren Rezeptoraffinität zum präsentierten Antigen zu gering ist, können nicht mit den fDZ interagieren. Ist eine Erkennung des präsentierten Antigens durch den BZR möglich, wird das Antigen von der B-Zelle internalisiert und nach Prozessierung als Peptid:MHCII-Komplex auf der Oberfläche präsentiert (De Silva und Klein, 2015; Vinuesa et al., 2010).

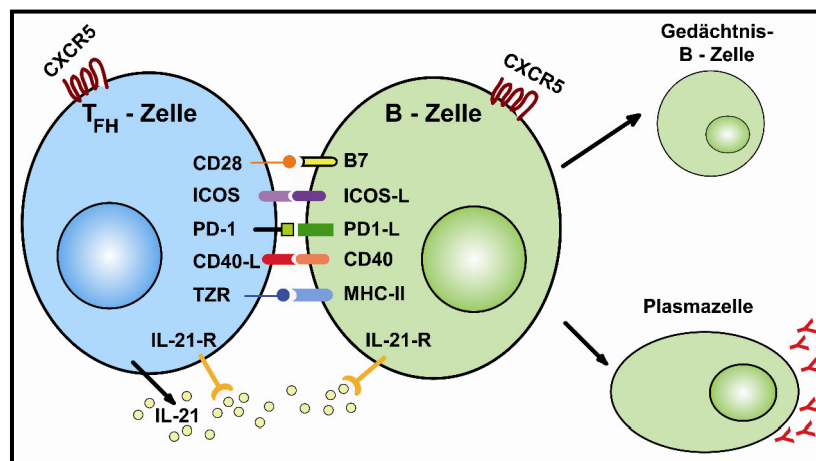
Diese Komplexe werden nun den T<sub>FH</sub>-Zellen präsentiert. B-Zellen mit niederaffinen BZR können den T<sub>FH</sub>-Zellen kein Antigen präsentieren. Sie wandern entweder zurück in die dunkle Zone, wo durch somatische Hypermutation die Affinität des BZR erhöht werden kann, oder sie sterben, da sie kein Überlebenssignal von den T<sub>FH</sub>-Zellen bekommen (Crotty, 2014; Wolniak et al., 2004). B-Zellen mit hoch-affinen, antigenspezifischen BZR können mit den T<sub>FH</sub>-Zellen interagieren. Zusätzlich zu CXCR5, ICOS, CD40-L und CD28, exprimieren T<sub>FH</sub>-Zellen PD-1 (*programmed cell death 1*) und den Rezeptor für IL-21 (IL-21-R), welcher auch von den B-Zellen exprimiert wird. Auf Keimzentrums-B-Zellen wird der ICOS-Ligand, CD40 und die Liganden für PD-1, PD-L1 und PD-L2 exprimiert (Abb. 4). Durch die T<sub>FH</sub>-Zellen erhalten die B-Zellen Überlebens- und Differenzierungssignale (Crotty, 2014; Klein und Dalla-Favera, 2008). Überlebenssignale werden u.a. durch die Interaktion von CD40 mit CD40-L auf den T<sub>FH</sub>-Zellen vermittelt. Bei Menschen mit Defizienzen von CD40 oder CD40-L ist die Bildung eines Keimzentrums nicht möglich und die Anzahl der T<sub>FH</sub>-Zellen ist erniedrigt (Bossaller et al., 2006; Foy et al., 1994).

IL-21, welches von T<sub>FH</sub>-Zellen sekretiert wird, fördert die Proliferation von Keimzentrums-B-Zellen und ist wichtig für die Differenzierung zu Plasmazellen (Moens und Tangye, 2014; Ozaki et al., 2004), wohingegen CD40-L die Plasmazellentstehung blockiert (Randall et al., 1998; Silvy et al., 1996). In Abwesenheit des CD40-Liganden und

Anwesenheit von IL-21 beginnen Keimzentrums-B-Zellen unkontrolliert zu Plasmazellen zu differenzieren (Arpin et al., 1995; Jourdan et al., 2009). Außerdem induziert IL-21 in autokriner Weise bei  $T_{FH}$ -Zellen die Produktion von weiterem IL-21, welches für die Differenzierung der  $T_{FH}$ -Zellen nötig ist (Moens und Tangye, 2014; Shekhar und Yang, 2012).

Wie CD28, ist ICOS ein kostimulatorisches Molekül, welches von aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen exprimiert wird und ist, wie bereits beschrieben, wichtig für die Differenzierung von  $T_{FH}$ -Zellen. Die Interaktion von ICOS auf den  $T_{FH}$ -Zellen und ICOS-L auf den B-Zellen besteht auch noch in den Keimzentren, jedoch ist hier die genaue Funktion dieser Wechselwirkung noch unklar (Crotty, 2014).

Die Interaktion von PD-1 mit den Liganden für PD-1 auf den B-Zellen, liefert inhibitorische Signale, die eine exzessive Proliferation von  $T_{FH}$ -Zellen verhindern. PD-1 defiziente Mäuse weisen eine erhöhte Anzahl an  $T_{FH}$ -Zellen auf (Good-Jacobson et al., 2010) und entwickeln spontan Autoimmunkrankheiten (Nishimura et al., 1999; Wang et al., 2010). Nach Interaktion der  $T_{FH}$ -Zellen mit den Keimzentrums-B-Zellen verlassen diese das Keimzentrum entweder als langlebige, Antikörper-sezernierende Plasmazellen oder als Gedächtnis-B-Zellen (Crotty, 2014).



**Abbildung 4: Interaktion zwischen  $T_{FH}$ - und B-Zellen.**

Die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit Peptid:MHC-II-Komplexen auf den Antigen-spezifischen B-Zellen, sowie die Interaktion von CD28 mit B7 Molekülen, ist ebenso wie die Bindung von ICOS an den ICOS-Liganden für die Weiterentwicklung von prä- $T_{FH}$ -Zellen zu reifen  $T_{FH}$ -Zellen von Bedeutung. Im Keimzentrum verhindert die Interaktion von PD-1 mit den PD-1-Liganden eine exzessive Proliferation der  $T_{FH}$ -Zellen. Die Bindung des CD40-Liganden an CD40 vermittelt der B-Zelle Überlebenssignale und reguliert gleichzeitig die Plasmazellentstehung.  $T_{FH}$ -Zellen sekretieren IL-21, welches über Bindung an den IL-21-Rezeptor auf B-Zellen die Entstehung von Plasmazellen fördert. Bei  $T_{FH}$ -Zellen wirkt IL-21 autokrin und fördert die vollständige Differenzierung zu  $T_{FH}$ -Zellen. Nach Beendigung der Keimzentrumsreaktion entwickeln sich aus den B-Zellen Gedächtnis-B-Zellen oder langlebige Plasmazellen, welche hoch-affine Antikörper sekretieren. Modifiziert nach Shekhar und Yang, 2012.

### 1.3.3 Die CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zell-vermittelte Immunantwort

#### 1.3.3.1 Die Aktivierung und Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren hauptsächlich zu zytotoxischen Zellen (CTL) und sind vorwiegend für die Eliminierung von Viren, aber auch von Tumorzellen und intrazellulären Pathogenen verantwortlich (Barry und Bleackley, 2002; Schirmacher et al., 1993; Yang et al., 2015). Präsentiert eine dendritische Zelle Antigen, können CD8<sup>+</sup> T-Zellen dieses durch ihren TZR erkennen (Angelosanto und Wherry, 2010). Meist ist zur vollständigen Aktivierung zusätzlich noch die Hilfe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nötig. Binden CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur gleichen Zeit wie die CD8<sup>+</sup> T-Zellen an dieselbe dendritische Zelle, wird diese dazu angeregt ihre kostimulatorische Aktivität zu erhöhen, was zur Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zelle führt (Bourgeois und Tanchot, 2003). CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Peptide, welche auf MHC-I präsentiert werden. MHC-I-Moleküle werden von jeder kernhaltigen Körperzelle exprimiert. Die Erkennung von Antigen führt zur Zerstörung der Zielzelle (Wong und Pamer, 2003). Dies kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen geschehen. Zum einen durch die Ausschüttung zytotoxischer Granula, wodurch es zur Freisetzung zytotoxischer Proteine wie Perforin und Granzym kommt. Durch Perforin wird die Zellmembran der Zielzelle permeabilisiert. Granzyme können nun in die Zelle eindringen und induzieren durch ihre proteolytische Aktivität Apoptose (Salti et al., 2011). Zum anderen kann durch Bindung des von CTL exprimierten Fas-Liganden an Fas auf der Zielzelle Apoptose ausgelöst werden (Medana et al., 2000).

#### 1.3.3.2 Die Erschöpfung der CD8<sup>+</sup> T Zell-Antwort

Werden CD8<sup>+</sup> T-Zellen dauerhaft durch Antigen stimuliert, wie es bei chronischen Infektionen oder durch das Vorhandensein von Tumorzellen der Fall sein kann, führt dies zu einer Erschöpfung oder „*Exhaustion*“ der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Es kommt schrittweise zum Funktionsverlust und abschließend zur Apoptose der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Crespo et al., 2013; Jiang et al., 2015). Das Phänomen der T-Zell-Erschöpfung wurde vor allem bei chronischer Virusinfektion, wie z.B. durch LCMV (*Lymphocytic choriomeningitis virus*) (Wherry et al., 2003; Wherry und Kurachi, 2015; Zajac et al., 1998), Hepatitis B- und C-Viren (Sumida et al., 2013; Ye et al., 2015) oder mit HIV (*human immunodeficiency virus*), (El-Far et al., 2008; Khaitan und Unutmaz, 2011; Wherry und Kurachi, 2015) beschrieben.

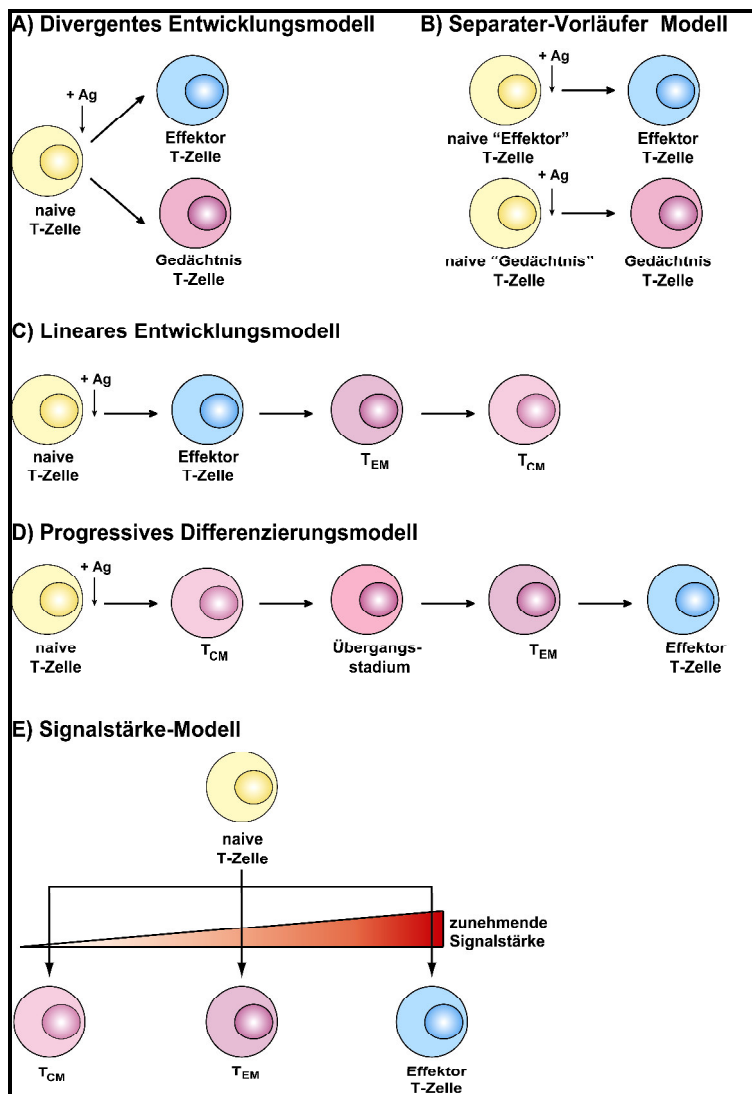
Bei chronischen Virusinfektionen kann es ebenfalls zum zeitweisen Funktionsverlust bei  $CD4^+$  T-Zellen kommen. Die  $CD4^+$  T-Zellen sind dann nicht mehr in der Lage, zur vollständigen Aktivierung der  $CD8^+$  T-Zellen beizutragen. Dieser Mechanismus verhindert normalerweise zu starke Immunreaktionen (Brooks et al., 2005; Yi et al., 2010). Eine hohe Viruslast und die verminderte Hilfe der  $CD4^+$  T-Zellen bei der Aktivierung von  $CD8^+$  T-Zellen korreliert mit der Stärke des Erschöpfungszustandes der  $CD8^+$  T-Zellen. Bei dauerhafter Stimulation der  $CD8^+$  T-Zelle während chronischen Infektionen beginnt die Zelle inhibitorische Moleküle zu exprimieren, was zum Funktionsverlust und zur Erschöpfung der Zellen führt. Das Anfangsstadium ist geprägt durch den graduellen Verlust des proliferativen Potentials, der Zytotoxizität und der IL-2 Produktion. Mit Fortschreiten der Erschöpfung ist auch die Produktion von  $TNF-\alpha$  und  $INF-\gamma$  sowie die Degranulation nicht mehr möglich, im Endstadium kommt es zudem zur Apoptose der Zellen (Schietinger und Greenberg, 2014; Wherry und Kurachi, 2015). Der inhibitorische Rezeptor PD-1 wird auf erschöpften T-Zellen in hohem Maße exprimiert (Jiang et al., 2015; Radziewicz et al., 2007). Signale über den TZR führen zur Expression von PD-1, welcher somit nicht nur auf erschöpften, sondern auch auf aktivierten Zellen exprimiert wird. Durch Interaktion von PD-1 mit dem PD-1-Liganden (PD-L1) werden inhibitorischen Signale an die T-Zelle vermittelt, um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden (Keir et al., 2008). Die Interaktion von PD-1 mit dem PD-1-Liganden, welcher auf antigenpräsentierenden Zellen oder im Falle einiger Virusinfektionen auch auf Hepatozyten exprimiert wird, ist ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung der Erschöpfung (Freeman et al., 2006; Radziewicz et al., 2007; Wherry und Kurachi, 2015). Durch Blockade der PD-1/PD-L1 Interaktion kann die Erschöpfung der  $CD8^+$  T-Zellen rückgängig gemacht werden und die Funktionalität der Zellen wieder hergestellt werden (Freeman et al., 2006; McGary et al., 2014). Ein weiterer inhibitorischer Rezeptor, der von erschöpften T-Zellen exprimiert wird, ist TIM-3 (*T cell immunoglobulin mucin-3*). Ähnlich wie bei PD-1 kann auch durch Blockierung der Interaktion von TIM-3 mit dessen Liganden die Funktion der  $CD8^+$  T-Zelle wiederhergestellt werden (Golden-Mason et al., 2009). Außerdem wurde auf erschöpften T-Zellen die Expression weiterer inhibitorischer Moleküle, wie KLRG-1, LAG-3, CD160, CD244 und CTLA-4, beschrieben (Schietinger und Greenberg, 2014; Wherry und Kurachi, 2015).

### 1.3.4 Die Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen

Eine der wichtigsten Funktionen des adaptiven Immunsystems ist die Ausbildung von Gedächtniszellen, welche bei Kontakt mit bereits bekanntem Antigen eine sehr schnelle und hoch effiziente Immunantwort auslösen. Nach Aktivierung durch Antigen beginnen T-Zellen zu proliferieren, sterben aber sehr schnell nach Entfernung des Antigens wieder ab. Nur ein kleiner Teil der T-Zellen überlebt diesen Prozess und entwickelt sich zu langlebigen CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen (Schietinger und Greenberg, 2014). Diese lassen sich in drei Gruppen einteilen: In die sogenannten Effektor-T-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ , *effector memory T cell*), in die zentralen Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{CM}$  *central memory T cell*) und in die  $T_{RM}$  (*tissue-resident memory T cell*).  $T_{RM}$  können nach einer Infektion in nicht-lymphatischen Geweben, wie z.B. in der Lunge oder im Epithel der Haut detektiert werden (Mueller et al., 2013; Schenkel und Masopust, 2014; Zhang und Lakkis, 2015).  $T_{EM}$  sind in der Milz, aber auch in der Peripherie lokalisiert, während  $T_{CM}$  hauptsächlich in lymphatischen Organen vorkommen.  $T_{CM}$  sind hoch proliferativ, produzieren IL-2 und sind im Vergleich zu  $T_{EM}$  relativ langlebig.  $T_{EM}$  zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Zytokinproduktion aus (Mueller et al., 2013; Tanel et al., 2009; Zhang und Lakkis, 2015). In der Maus werden  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$  hauptsächlich durch die Expression von CD62L und CD44 unterschieden (Gupta und Garg, 2015; Hu und August, 2008; Krishnan et al., 2007), während im Menschen noch weitere Moleküle zur Unterscheidung herangezogen werden können (Farber et al., 2014). Murine  $T_{EM}$  sind als CD62L<sup>niedrig</sup> und CD44<sup>hoch</sup> charakterisiert, während  $T_{CM}$  als CD62L<sup>hoch</sup> und CD44<sup>hoch</sup> definiert werden (Gupta und Garg, 2015; Hu und August, 2008; Krishnan et al., 2007).

Wie Gedächtnis-T-Zellen entstehen, ist noch nicht genau geklärt, aber es existieren mehrere Modelle dazu, welche in Abbildung 5 schematisch dargestellt sind. Beim divergenten Entwicklungsmodell (Abb. 5 A) wird davon ausgegangen, dass aus naiven T-Zellen nach Antigenkontakt entweder Effektor-T-Zellen oder Gedächtnis-T-Zellen entstehen können (Farber et al., 2014; Kaech et al., 2002). Eine weitere Hypothese besagt, dass Effektor-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen aus separaten Vorläuferzellen, entstehen (Abb. 5 B). Bei diesen Vorläuferzellen handelt es sich um naive T-Zellen, welche bereits auf die Entwicklung zu Effektor-T-Zellen oder Gedächtnis-T-Zellen „vorprogrammiert“ sind. (Kaech und Cui, 2012). Das lineare Entwicklungsmodell (Abb. 5 C) postuliert, dass naive T-Zellen nach Antigenkontakt zu Effektor-T-Zellen differenzieren, welche im weiteren Verlauf der Immunreaktion zu  $T_{EM}$  differenzieren, aus welchen schließlich  $T_{CM}$  entstehen (Opata und Stephens, 2013; Tanel et al., 2009). Beim progressiven Differenzierungsmodell (Abb. 5 D) entstehen nach Antigenkontakt aus naiven T-Zellen zentrale Gedächtniszellen, welche über

ein Zwischenstadium zu Effektor-Gedächtniszellen und letztendlich zu Effektor-T-Zellen differenzieren (Farber et al., 2014; Tanel et al., 2009). Das Signalstärke-Modell (Abb. 5 E) geht davon aus, dass die Stärke und Dauer der Signale (TZR-Stimulation, Kostimulation, Zytokine) Einfluss auf die Entstehung der beiden Gedächtnis-T-Zellpopulationen hat. Sehr starke und lang anhaltende Signale führen zur Generierung von Effektorzellen, starke und andauernde Signale zur Entstehung von Effektor-T-Gedächtniszellen und schwächere, kurzzeitige Signale zur Differenzierung in zentrale Gedächtniszellen (Daniels und Teixeira, 2015; Kaech und Cui, 2012). Speziell für die Entstehung von  $CD8^+$  Gedächtniszellen deutet vieles auf das Signalstärke-Modell hin. Bei chronischen Infektionen, wo ein andauernder starker Stimulus präsent ist, wird die Differenzierung zu  $CD8^+$   $T_{EM}$  favorisiert, während bei akuten, kurzzeitigen Infektionen eher die Generierung von  $CD8^+$   $T_{CM}$  stattfindet (Harty und Badovinac, 2008; Mueller et al., 2013).



**Abbildung 5: Verschiedene Modelle zur Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen.**

A) Beim divergenten Entwicklungsmodell entstehen aus einer naiven T-Zelle nach Antigenkontakt entweder Effektor-T-Zellen oder Gedächtnis-T-Zellen. B) Effektor-T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen entstehen aus verschiedenen „vorprogrammierten“ naiven T-Zellen. C) Das lineare Entwicklungsmodell postuliert, dass naive T-Zellen nach Antigenkontakt zu Effektor-T-Zellen differenzieren, aus welchen im weiteren Verlauf der Immunreaktion  $T_{EM}$  und letztendlich  $T_{CM}$  entstehen. D) Beim progressiven Differenzierungsmodell entstehen aus naiven T-Zellen nach Antigenkontakt  $T_{CM}$ , welche über ein Übergangsstadium zu  $T_{EM}$  und letztendlich zu Effektor-T-Zellen differenzieren. E) Beim Signalstärke-Modell ist die Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-T-Zellen abhängig von der Stärke und Dauer der bei Aktivierung von naiven T-Zellen übermittelten Signale. Sehr starke, langandauernde Signale führen vermehrt zur Bildung von Effektor-T-Zellen, starke, anhaltende Signale zur Entstehung von  $T_{EM}$ , während eher kurzzeitige, schwächere Signale die Differenzierung zu  $T_{CM}$  fördern.  $T_{CM}$  = zentrale Gedächtnis-T-Zelle,  $T_{EM}$  = Effektor-T-Gedächtniszelle.

## 1.4 Der CD30-Rezeptor

Der CD30-Rezeptor wurde im Jahre 1982 erstmals auf Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen entdeckt (Schwab et al., 1982). Die Einordnung in die Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) Familie erfolgte 1992 nach der erstmaligen Klonierung von CD30 (Dürkop et al., 1992). Die TNF-Rezeptoren sind strukturell verwandte Typ I Transmembranproteine, die extrazelluläre Domäne ist innerhalb dieser Familie hoch konserviert. Nach Bindung an ihren jeweiligen Liganden kommt es zur Trimerisierung der Rezeptoren und somit zur Signalweiterleitung (Smith et al., 1994). Die Mitglieder der TNF-R Familie können in drei Gruppen eingeteilt werden: Decoy-Rezeptoren, TRAF (*TNF receptor-associated factor*) -bindende Rezeptoren und Todesrezeptoren. Decoy-Rezeptoren haben keine Signaldomäne und können somit keine Signale weiterleiten. Sie konkurrieren mit den signaltransduzierenden Rezeptoren um die Liganden und regulieren so ihre Aktivität. TRAF-bindende Rezeptoren haben Bindestellen für TRAF-Proteine in ihrer zytoplasmatischen Domäne. Die Signalweiterleitung erfolgt über die TRAF-Proteine. Todesrezeptoren besitzen im intrazellulären Teil eine Todesdomäne. Die Signalweiterleitung über diese TNF-R führt oft zur Apoptose der Zelle. Todesdomänen können aber auch mit Hilfe von Adapterproteinen mit TRAF-Molekülen interagieren (Hehlhans und Pfeffer, 2005; Park et al., 2007). Murines CD30 weist eine große Homologie zu humanen CD30 auf, jedoch ist murines CD30 mit 498 Aminosäuren um 97 Aminosäuren kürzer als humanes CD30 (Bowen et al., 1996). Der murine CD30-Rezeptor ist ein ca. 110 kDa großes Typ-I Transmembran-Glykoprotein, dessen extrazelluläre Domäne aus sechs Cystein-reichen Regionen besteht (Chiarle et al., 1999; Horie und Watanabe, 1998). Dieser extrazelluläre Teil kann durch Metalloproteasen abgespalten werden und geht als lösliches CD30 ins Blut über (Hansen et al., 1995). Die zytoplasmatische Domäne des CD30-Rezeptors weist keine katalytische Aktivität auf, die Signalweiterleitung erfolgt hier über TRAF-Proteine. Der zytoplasmatische Teil des CD30-Rezeptors enthält drei Subdomänen, D1, D2 und D3, die zwischen Mensch, Maus und Ratte hoch konserviert sind. D2 und D3 enthalten TRAF-Bindestellen, die mit TRAF1, TRAF2, TRAF3 und TRAF5 interagieren können. Im Bereich von D1 konnte keine TRAF-Bindestelle nachgewiesen werden (Aizawa et al., 1997; Boucher et al., 1997; Duckett et al., 1997).

CD30 wird nur auf aktivierten B- und T-Zellen exprimiert. Kommt es zur Interaktion mit dem CD30-Liganden (CD30-L), welcher auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, aktivierten Makrophagen und Granulozyten exprimiert wird (Barbieri et al., 2015; Hargreaves und Al-Shamkhani, 2002), führt dies zur Trimerisierung des Rezeptors und zur Aktivierung des NFkB-Signalweges (Boddicker et al., 2015; Buchan und Al-Shamkhani, 2012; Ho et al.,

2009). Auch die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK, ERK und P38 konnte in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden (Harlin et al., 2002; Watanabe et al., 2012; Zheng et al., 2003). CD30-vermittelte Signale können in Abhängigkeit vom Zelltyp und weiteren kostimulatorischen Faktoren antiproliferativ und apoptotisch, aber auch proliferativ und überlebensfördernd wirken (Lee et al., 2015; Schneider und Hübinger, 2002).

Die Funktion von CD30 ist auch über 30 Jahre nach seiner Entdeckung noch nicht vollständig aufgeklärt. Die meisten Untersuchungen zur physiologischen Funktion von CD30-Signalen in T-Zellen wurden in den Jahren nach dessen Klonierung durchgeführt, neuere Experimente untersuchen hauptsächlich den Einfluss von CD30 in der Pathogenese. Da CD30 nur auf aktivierten, nicht aber auf naiven T-Zellen exprimiert wird, ist eine Funktion in der T-Zell-abhängigen Immunantwort sehr wahrscheinlich. Kontroverse Daten gibt es zur CD30-Expression auf  $T_H1$  und  $T_H2$  Zellen. Während einige Gruppen publizierten, dass CD30 nur auf  $T_H2$  Zellen exprimiert wird (Del Prete et al., 1995; Romagnani et al., 1995; Yamamoto et al., 2000), fanden andere Forscher keinen Unterschied bezüglich der CD30-Expression auf  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Zellen (Hamann et al., 1996; Petkova et al., 2000). Neuere Studien zeigen, dass CD30-Signale bei der  $T_H1$ -vermittelten Immunantwort eine Rolle spielen (Gaspal et al., 2008; Tang et al., 2008). Für  $CD8^+$  T-Zellen wurde ein CD30-regulierter Apoptoseweg beschrieben. Bei aktivierten  $CD8^+$  T-Zellen, welche CD30 sowie auch CD30-L exprimieren, konnte durch eine Blockade der CD30/CD30L Interaktion die Apoptoserate um 40-60 % gesenkt werden. Dieser Mechanismus ist Fas-unabhängig (Telford et al., 1997). Jedoch kann nicht genau bestimmt werden, ob die CD30-Signale zum Sterben der  $CD8^+$  T-Zellen führen oder ob dies durch Signale über den CD30-Liganden ausgelöst wird, da für das CD30/CD30L System auch eine „reverse Signalweiterleitung“ beschrieben ist (Wiley et al., 1996). CD30-Knockout Mäuse weisen eine gestörte sekundäre Immunantwort auf, da die Keimzentren nicht aufrechterhalten werden können. Auch fehlen diesen Mäusen  $CD4^+$  Gedächtnis-T-Zellen. Allerdings handelt es sich bei diesem Mausmodell um einen konventionellen Knockout, so dass ein möglicher Einfluss der B-Zellen nicht völlig ausgeschlossen werden kann (Gaspal et al., 2005). Es gibt jedoch eine weitere Studie, in welcher die CD30-Expression im Zusammenhang mit Gedächtnis-T-Zellen steht. Nach unspezifischer Stimulierung von  $CD4^+$  T-Zellen, exprimierten die meisten  $CD30^+$  Zellen das Molekül CD45RO, welches im Menschen ein Marker für Gedächtnis-T-Zellen ist (Ellis et al., 1993; Kennedy et al., 2006). In gesunden Individuen wird CD30 nur auf wenigen Zellen, die um den B-Zell-Follikel in lymphatischen Geweben und am Rand von Keimzentren lokalisiert sind, exprimiert (Stein et al., 1985). Bei diesen Zellen handelt es sich hauptsächlich um



aktivierte B- und T-Zellen (Pizzolo und Romagnani, 1995). Aufgrund der geringen Anzahl der CD30<sup>+</sup> Zellen ist bei gesunden Menschen kein oder nur sehr geringe Mengen an löslichem CD30 im Serum nachweisbar. Erhöhte Konzentrationen von löslichem CD30 im Blut lassen sich bei Patienten mit CD30-exprimierenden Tumoren feststellen und dienen hier als Prognosemarker (Amedei et al., 2013; Kadin et al., 2012; Nadali et al., 1994). Sehr hohe Mengen von CD30 werden auf der Oberfläche des Hodgkin-Lymphoms, einem B-Zell Tumor und des anaplastisch großzelligen Lymphoms (ALCL, *anaplastic large cell lymphoma*), einem T-Zell-Lymphom, exprimiert (Schirrmann et al., 2014; Stein et al., 2000). In weiteren B- und T-Zell-Lymphomen, wie dem primären Effusionslymphom, dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom oder dem peripheren T-Zell-Lymphom, konnte CD30 mit unterschiedlichen Expressionsstärken auf den Zellen nachgewiesen werden (de Leval und Gaulard, 2010; Kumar und Younes, 2014).

Bei chronischer Stimulation des Immunsystems, wie es bei Autoimmunerkrankheiten oder Virusinfektionen der Fall ist, wird oft eine erhöhte Anzahl von CD30<sup>+</sup> Lymphozyten beobachtet. Typische Beispiele für Autoimmunerkrankungen mit erhöhten Zahlen von CD30-exprimierenden Lymphozyten sind die rheumatoide Arthritis (Barbieri et al., 2015; Gerli et al., 1995), Lupus erythematoses (Cabrera et al., 2013) oder Diabetes mellitus (Baker et al., 2007; Chakrabarty et al., 2003). Viele Lymphozyten mit hoher CD30-Expression findet man vor allem bei Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (Haque et al., 2011; Herbst und Stein, 1993), Hepatitis B- und C-Viren (Fattovich et al., 1996; Foschi et al., 2000) und dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (Kadin, 2000; Romagnani et al., 1996).

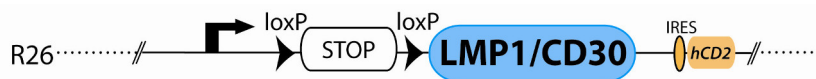
## 1.5 Mausmodelle

Um den Einfluss von CD30 auf T-Zellen zu untersuchen, existieren in unserer Arbeitsgruppe zwei verschiedene transgene Mausstämme. Beide Mausstämme wurden von Petra Fiedler in unserem Labor generiert.

### 1.5.1 Die LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup>-Mauslinie

LMP1 ist ein Membranprotein des Epstein-Barr-Virus. LMP1 verfügt über mehrere Transmembrandomänen, die in der Plasmamembran aggregieren, was zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von LMP1 führt (Gires et al., 1997). In unserem Labor wurde bereits durch Fusion der Transmembrandomänen des LMP1-Proteins mit den intrazellulären Teil des CD40-Rezeptors ein konstitutiv aktiver CD40-Rezeptor generiert (Hömig-Hölzel et

al., 2008). Durch Fusion der Transmembrandomäne des LMP1-Proteins (AS 1-190) mit der Signaldomäne des murinen CD30-Proteins (AS 311-498) entsteht das Fusionsprotein LMP1/CD30, welches ligandenunabhängig ein konstitutiv aktives CD30-Signal generiert. Durch homologe Rekombination wurde das LMP1/CD30 Gen in das erste Intron des *rosa26*-Lokus gebracht, das Fusionsprotein ist somit unter Kontrolle des ubiquitär aktiven *rosa26*-Promotors. Wie in Abbildung 6 schematisch dargestellt, wurde hinter dem LMP1/CD30 Gen das humane CD2 (hCD2) als Reportergen inseriert, dieses wird über eine *IRES*-Stelle gleichzeitig mit dem LMP1/CD30-Gen exprimiert. Mit Hilfe des hCD2 Reportergens können mittels durchflusszytometrischer Analysen LMP1/CD30-exprimierende Zellen detektiert werden. Um eine Cre-abhängige konditionale Expression von LMP1/CD30 sowie des Reporters hCD2 zu ermöglichen, wurde vor dem Transgen eine loxP-flankierte STOP Kasette eingebracht (Fiedler, 2011).

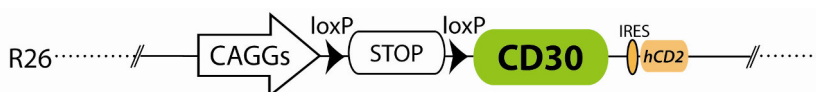


**Abbildung 6: Darstellung des rekombinanten *rosa26*-Lokus der LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup> Mauslinie.**

Das Fusionsgen LMP1/CD30 steht, wie auch das Reportergen hCD2 unter Kontrolle des *rosa26*-Promotors. Die loxP-flankierte STOP-Kassette wird durch Kreuzung mit Cre-Mäusen deletiert, so dass die Expression von LMP1/CD30 und dem Reporter hCD2 möglich ist (Abbildung aus Dissertation von Petra Fiedler, 2011)

### 1.5.2 Die CD30<sup>flSTOP</sup>-Mauslinie

Im Gegensatz zu dem LMP1/CD30-Fusionsprotein, welches konstitutiv aktiv ist, ist in dieser Mauslinie die Aktivierung des CD30-Rezeptors ligandenabhängig. Diese Mauslinie sollte dazu dienen, CD30 in Zellen zu exprimieren, in denen es normalerweise nicht exprimiert wird. Wie auch bei der LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup>-Mauslinie wurde das murine CD30-Gen, wie auch das hCD2 Reportergen in den *rosa26*-Lokus eingebracht (Abb. 7). Ebenfalls ist hier vor dem CD30-Gen eine loxP-flankierte STOP-Kassette inseriert, welche durch Kreuzung der CD30<sup>flSTOP</sup>-Maus mit einer Cre-Mauslinie deletiert wird. Das transgene CD30-Gen, wie auch das hCD2 Reportergen, steht in dieser Mauslinie unter Kontrolle des starken CAGGs-Promotors (CMV *early enhancer/chicken β-actin/ rabbit globulin promoter*) (Fiedler, 2011).



**Abbildung 7: Darstellung des rekombinanten *rosa26*-Lokus der CD30<sup>flSTOP</sup> Mauslinie.**

Das murine CD30 steht, wie auch das Reportergen hCD2, unter Kontrolle des CAGGs Promotors. Die loxP-flankierte STOP-Kassette wird durch Kreuzung mit Cre-Mäusen deletiert, so dass eine Expression von CD30 und dem Reporter hCD2 möglich ist (Abbildung aus Dissertation von Petra Fiedler, 2011).

## 2 Zielsetzung

Der CD30-Rezeptor wird auf aktivierten B- und T-Lymphozyten exprimiert. Obwohl CD30 schon in den frühen 1980er Jahren entdeckt wurde, ist die physiologische Funktion dieses Moleküls bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass bei starker chronischer Stimulation des Immunsystems, wie z.B. bei chronischen Viruserkrankungen oder bei Autoimmunerkrankungen, vermehrt CD30-exprimierende Lymphozyten auftreten. Es ist jedoch unklar, welche Rolle diese CD30<sup>+</sup> Lymphozyten bei der Immunantwort spielen. Einige Tumoren, wie beispielsweise das anaplastische-großzellige Lymphom, ein T-Zell-Lymphom, sind dadurch gekennzeichnet, dass sie CD30 sehr hoch auf ihrer Oberfläche exprimieren. Ob CD30-Signale zur Pathogenese dieser Tumoren beitragen, ist jedoch noch nicht bekannt.

Um die physiologische Rolle des CD30-Rezeptors und dessen Einfluss auf die Lymphom-Entstehung in T-Zellen zu untersuchen, wurden in unserem Labor zwei konditionale transgene Mausstämme generiert, die die Transgene LMP1/CD30 bzw. CD30 abhängig von der Cre-Rekombinase exprimieren. Während CD30-exprimierende Zellen durch einen Liganden stimuliert werden müssen, ist in LMP1/CD30-exprimierenden Zellen das CD30-Signal konstitutiv aktiv.

In dieser Arbeit sollten diese beiden Mausstämme mit CD4Cre-Mäusen verpaart werden, um eine T-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 bzw. CD30 zu erreichen. Durch die Analyse der LMP1/CD30//CD4Cre- und der CD30//CD4Cre-Mäuse, sollten folgende Fragen beantwortet werden: (i) Wie beeinflussen CD30-Signale die Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen? Um diese Frage zu beantworten, wurde die T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung in den sekundären lymphoiden Organen untersucht. (ii) Welche Signalwege werden in T-Zellen durch CD30 aktiviert? Da in den T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse das CD30-Signal konstitutiv aktiv und ligandenunabhängig ist, sollte durch Western-Blot-Analysen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen dieser Mäuse aufgeklärt werden, welche Signalwege durch CD30-Signale aktiviert werden. (iii) Führen deregulierte CD30-Signale in T-Zellen zur Tumorentstehung? Im Langzeitversuch sollte herausgefunden werden, ob die T-Zell-spezifische Expression dieser beiden Transgene zur Entstehung von T-Zell-Lymphomen führt.

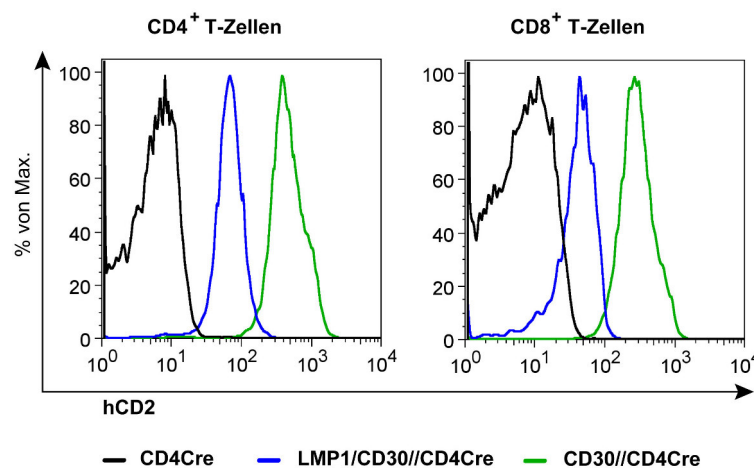
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Einfluss des CD30-Signals auf T-Zellen

##### 3.1.1 Die T-Zell-spezifische Expression der Transgene LMP1/CD30, CD30 und des Reporters hCD2

Um eine T-Zell-spezifische Expression der Transgene LMP1/CD30 und CD30 zu erreichen, wurden LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup>- und CD30<sup>flSTOP</sup>-Mäuse mit CD4Cre-Mäusen verpaart, um LMP1/CD30//CD4Cre- bzw. CD30//CD4Cre-Mäuse zu erhalten. In diesen Mäusen steht die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD4-Promotors, was zur Expression der Cre-Rekombinase und damit zur Deletion der STOP-Kassette in CD4<sup>+</sup>-Zellen führt. T-Zellen sind in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung doppelt-positiv, d.h. sie exprimieren CD4 sowie auch CD8. Da die Cre-Rekombinase bereits in diesem doppelt-positiven Stadium zur Deletion der STOP-Kassette führt, werden das hCD2 Reportergen und die Transgene LMP1/CD30 bzw. CD30 sowohl in CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert (Lee et al., 2001).

Um zu untersuchen, wie hoch die Deletionseffizienz der STOP-Kassette in den reifen T-Zellen ist, wurde mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse die Expression des Reporters hCD2 untersucht. Als Kontrollmäuse wurden für alle durchgeführten Experimente CD4Cre-Mäuse verwendet.



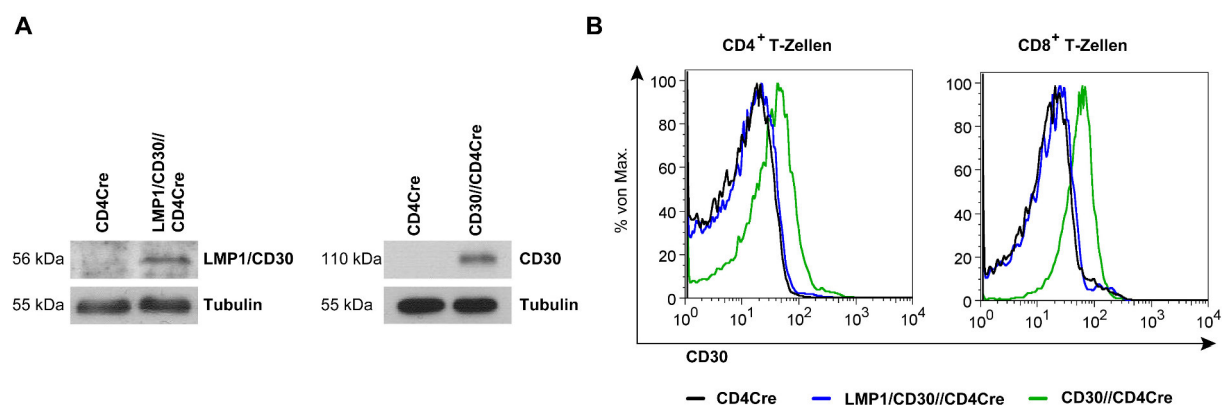
**Abbildung 8: Das Reportergen hCD2 wird in den T-Zellen der transgenen Mäuse exprimiert.**

Milzzellen von Kontrollmäusen (schwarz), CD30//CD4Cre-Mäusen (grün) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden mit  $\alpha$ -hCD2-,  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD4- und  $\alpha$ -CD8-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die hCD2 Expression auf CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (links) und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (rechts). Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel für 20-50 Mäuse pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen.

Die Deletion der STOP-Kassette erfolgte in beiden transgenen Mausstämmen in der gesamten T-Zellpopulation der Milz, so dass in nahezu jeder T-Zelle in diesen Mäusen der Reporter hCD2 und somit auch LMP1/CD30 bzw. CD30 exprimiert wurde (Abb. 8). Die stärkere Expression von hCD2 in den T-Zellen der CD30//CD4Cre- im Vergleich zu

LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen ist auf den stärkeren CAGGs-Promotor zurückzuführen. In LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen steht die Expression der Kasette hingegen unter dem schwächeren, endogenen Promotor des *rosa26*-Lokus (Kapitel 1.5 Einleitung). Auch im Blut, in Lymphknoten, im Thymus und in den Peyerschen Plaques der transgenen Mäuse wurde der Reporter hCD2 auf 95-100 % der T-Zellen exprimiert (nicht gezeigte Daten).

Um zu zeigen, dass neben hCD2 auch die Proteine LMP1/CD30 bzw. CD30 exprimiert werden, wurden T-Zellen aus der Milz der jeweiligen Mäuse isoliert und Proteinextrakte hergestellt. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Expression der beiden Transgene untersucht. Da der verwendete Antikörper an den intrazellulären Anteil des CD30-Proteins bindet, kann sowohl die Expression von CD30, als auch die Expression des LMP1/CD30 Fusionsproteins nachgewiesen werden kann.



**Abbildung 9: Die T-Zellen der transgenen Mäuse exprimieren LMP1/CD30 bzw. CD30.**

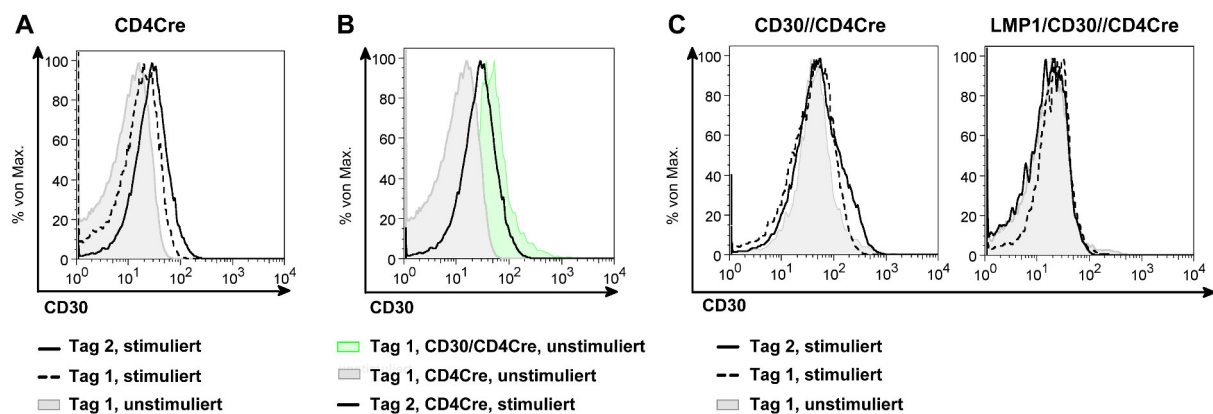
A) Nachweis der Expression von LMP1/CD30 bzw. CD30 in aus der Milz isolierten T-Zellen mittels Western Blot Analyse. Der Nachweis von Tubulin diente als Ladekontrolle. B) Durchflusszytometrische Analyse der CD30-Expression auf T-Zellen, die aus LMP1/CD30//CD4Cre- (blau), CD30//CD4Cre- (grün) und CD4Cre-Kontrollmäusen (schwarz) isoliert worden waren. Hierfür wurden Milzzellen mit  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD8- und  $\alpha$ -CD30-Antikörpern gefärbt. Dargestellt ist die CD30-Expression auf CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, sowie auf CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Alle Ergebnisse wurden an 8-14 Wochen alten Mäusen erhoben und für mindestens fünf Mäuse pro Genotyp bestätigt.

Die Western-Blot-Analysen ergaben, dass LMP1/CD30 bzw. CD30 in den T-Zellen der transgenen Mäuse exprimiert wurde. Bei T-Zellen von LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen konnte eine spezifische Bande bei ca. 56 kDa detektiert werden, was der erwarteten Größe des LMP1/CD30-Proteins entspricht. Bei T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse wurde eine spezifische Bande bei ca. 110 kDa nachgewiesen. Dies stimmt mit der Größe des murinen CD30-Rezeptors überein (Bowen et al., 1996). Da CD30 nur von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, konnte in Proteinextrakten von Kontrollmäusen kein CD30 nachgewiesen werden (Abb. 9 A).

Zusätzlich zu den Western-Blot-Experimenten wurde von aus der Milz isolierten T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse die CD30-Expression auf der Zelloberfläche mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht. Sowohl in  $CD4^+$ , wie auch in  $CD8^+$  T-Zellen konnte, im Gegensatz zu T-Zellen von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen, CD30 auf der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 9 B).

### 3.1.2 Die T-Zell-spezifische Expression und Regulation von CD30

CD30 wird normalerweise nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Bei in vitro stimulierten T-Zellen erreicht die CD30-Expression 48 Stunden nach Stimulierung das Maximum (Barbieri et al., 2015; Ellis et al., 1993). Um herauszufinden, ob die CD30-Expression auf stimulierten T-Zellen von Kontrollmäusen, mit der aberranten CD30-Expression von unstimulierten T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse vergleichbar ist, wurden  $CD4^+$  T-Zellen aus den Milzen isoliert, für zwei Tage mit ( $\alpha$ -CD3- +  $\alpha$ -CD28-Antikörpern) und ohne Stimulus kultiviert und täglich die CD30-Expression gemessen.  $CD4^+$  T-Zellen aus Milzen von LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen wurden auf die gleiche Weise kultiviert, um den Einfluss des konstitutiven CD30-Signals auf die Expression von CD30 zu untersuchen.



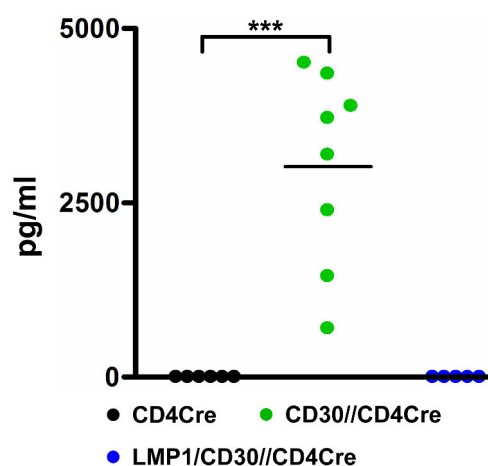
**Abbildung 10: CD30-Expression auf stimulierten  $CD4^+$  T-Zellen in vitro.**

Aus der Milz isolierte  $CD4^+$  T-Zellen wurden zwei Tage lang ohne Stimulus und mit Stimulus ( $\alpha$ -CD3- +  $\alpha$ -CD28-Antikörpern) kultiviert. An Tag 1 und 2 wurden die Zellen mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD30-Antikörpern und TOPRO-3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die CD30-Expression auf lebenden (TOPRO-3 negativen)  $CD4^+$  T-Zellen. A) Vergleich der CD30-Expression von unstimulierten, und stimulierten (Tag 1 und 2)  $CD4^+$  T-Zellen von Kontrollmäusen (CD4Cre). B) Vergleich der CD30-Expression von unstimulierten  $CD4^+$  T-Zellen der CD30/CD4Cre-Mäuse mit stimulierten (Tag 2) und unstimulierten  $CD4^+$  T-Zellen von Kontrollmäusen (CD4Cre). C) Vergleich der CD30-Expression von unstimulierten, und stimulierten (Tag 1 und 2)  $CD4^+$  T-Zellen von CD30//CD4Cre-Mäusen (links) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts). Die Analysen wurden mit 2-3 Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen durchgeführt.

Abbildung 10 A zeigt die CD30-Expression auf unstimulierten und stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Kontrollmäusen. Die Stimulierung führte bereits an Tag eins zu einem geringfügigen Anstieg der CD30-Expression. An Tag zwei stieg die Expression von CD30 im Vergleich zu Tag eins noch weiter an. Wurden die Zellen drei Tage lang stimuliert, war keine weitere Steigerung der CD30-Expression erkennbar (nicht gezeigte Daten).

Vergleicht man die CD30-Expression von unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD30/CD4Cre-Mäuse mit der CD30-Expression von stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse (Tag 2), zeigte sich, dass die Expression von CD30 auf den unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD30/CD4Cre-Mäuse höher war als auf den stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse (Abb. 10 B). Da auf stimulierten Kontroll-T-Zellen die Expression von CD30 an Tag zwei am höchsten ist (Barbieri et al., 2015; Ellis et al., 1993), wies dies darauf hin, dass auf den unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD30/CD4Cre-Mäuse eine relativ hohe Expression von CD30 erreicht wurde. Auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse konnte durch Stimulation der Zellen nur eine minimale Steigerung der CD30-Expression und in LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse keine Steigerung der CD30-Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen erreicht werden (Abb. 10 C).

CD30 wird auf verschiedenen Tumoren und bei vielen viralen Infekten auf Lymphozyten stark exprimiert. In diesen Fällen ist zusätzlich zur erhöhten CD30-Expression auf den Zellen meist auch lösliches CD30 im Blut nachweisbar. Um eine zu starke Expression von CD30 auf der Zelloberfläche zu vermeiden, wird der extrazelluläre Teil des CD30-Proteins abgespalten und liegt dann als lösliches CD30 im Serum vor (Hansen et al., 1995). Um herauszufinden, ob auch bei den CD30/CD4Cre-Mäusen eine Abspaltung von CD30 von der Oberfläche der T-Zellen stattfand, wurde mit Hilfe eines ELISAs untersucht, ob lösliches CD30 im Serum dieser Mäuse vorhanden ist.



**Abbildung 11: Lösliches CD30 ist im Serum von CD30//CD4Cre-Mäusen nachweisbar.**

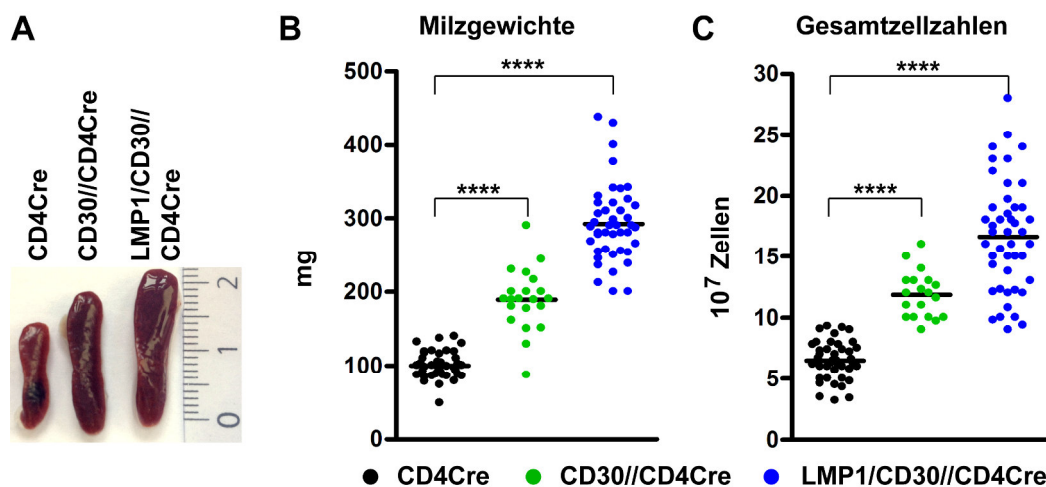
Ergebnisse des ELISAs zum Nachweis von löslichem CD30 im Serum von CD4Cre-Kontrollmäusen (schwarz), CD30//CD4Cre (grün) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau). Analysiert wurden Seren von 8-14 Wochen alten Mäusen. \*\*\*  $P < 0,001$ ;  $n = 5-8$ .



In allen untersuchten Seren der CD30//CD4Cre-Mäuse konnte lösliches CD30 detektiert werden, während in den Seren der Kontroll- und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse kein lösliches CD30 nachgewiesen werden konnte (Abb. 11).

### 3.1.3 Die Expression von LMP1/CD30 und CD30 auf T-Zellen führt zur Splenomegalie und erhöhten Zellzahlen

Auf dem anaplastischen großzelligen Lymphom, wird CD30 stark exprimiert (Schirrmann et al., 2014; Stein et al., 2000). Um zu untersuchen, ob das konstitutiv aktive CD30-Signal in T-Zellen von LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen, sowie die aberrante Expression von CD30 auf den T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse zur Expansion der T-Zellen und somit zu einer Zunahme der Milzgrößen führt, wurden die Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-, CD30//CD4Cre- und von Kontrollmäusen hinsichtlich Größe und Gewicht miteinander verglichen und die Gesamtzellzahlen der Milzen bestimmt.



**Abbildung 12: Die T-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 bzw. CD30 führt zur Splenomegalie und erhöhten Gesamtzellzahlen in der Milz.**

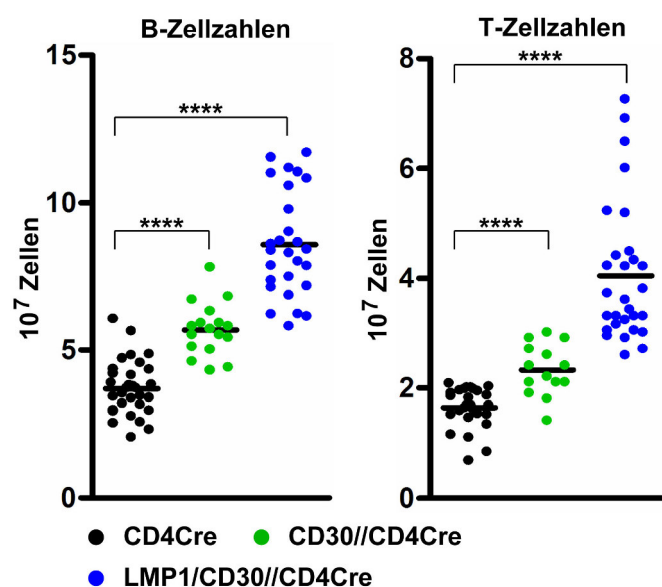
A) Größenvergleich von Milzen einer CD4Cre-Kontrollmaus (links), einer CD30//CD4Cre- (mitte) und einer LMP1/CD30//CD4Cre-Maus (rechts). B) Darstellung der Milzgewichte von Kontrollmäusen (schwarz), CD30//CD4Cre-Mäusen (grün) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau). C) Gesamtzellzahlen der Milzen von Kontrollmäusen (schwarz), CD30//CD4Cre-Mäusen (grün) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau). Gezeigt sind die Werte von 8-14 Wochen alten Mäusen. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ;  $n = 20-40$ . Der schwarze Balken kennzeichnet den Mittelwert aller Datenpunkte pro Genotyp.

Das konstitutiv aktive CD30-Signal in T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse führte zu einer starken Vergrößerung der Milz, die Überexpression von CD30 auf den T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse hingegen nur zu einer moderaten Splenomegalie (Abb. 12 A). Die Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse waren im Durchschnitt ca. 3-mal schwerer als die



Milzen der Kontrollmäuse, während die Milzen der CD30//CD4Cre-Mäuse im Vergleich zu Milzen der Kontrollmäuse nur in etwa doppelt so schwer waren (Abb. 12 B). Ähnlich verhielt es sich mit den Gesamtzellzahlen der Milz, welche bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen durchschnittlich 2,7-fach, und in den Milzen der CD30//CD4Cre-Mäusen durchschnittlich 1,7-fach erhöht waren (Abb. 12 C).

Um herauszufinden, ob die Splenomegalie durch eine Expansion der T-Zellen ausgelöst wurde, wurden die absoluten Zellzahlen von B-Zellen und T-Zellen ermittelt. Hierzu wurden Milzzellen mit für diese Zellpopulationen spezifischen Antikörpern gefärbt und mit Hilfe des Durchflusszytometers die prozentualen Anteile dieser Zellen ermittelt. Anhand dieser Daten wurden die absoluten B- und T-Zellzahlen berechnet.



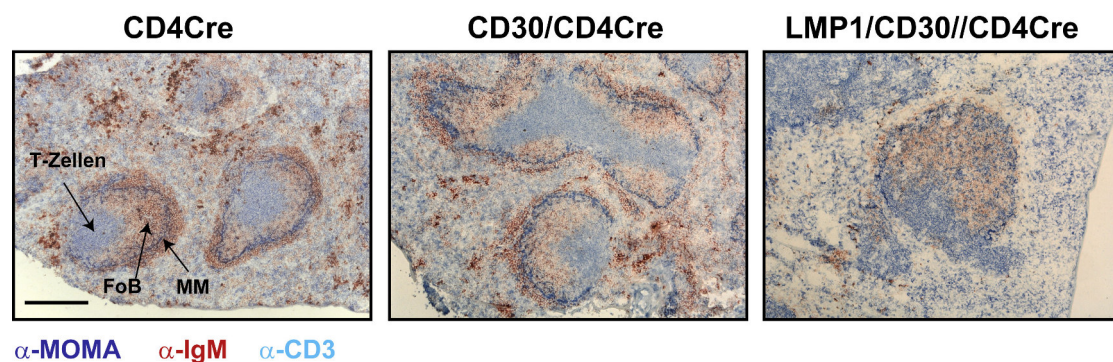
**Abbildung 13: Die T-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 bzw. CD30 führt zu erhöhten B- und T-Zellzahlen in der Milz.**

Milzzellen von CD4Cre-Kontrollmäusen (schwarz), CD30//CD4Cre-Mäusen (grün) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden mit  $\alpha$ -B220- und  $\alpha$ -CD3-Antikörpern gefärbt. Nach durchflusszytometrischer Analyse konnten die prozentualen Anteile der B- ( $B220^+$ ) und T-Zellen ( $CD3^+$ ) bestimmt werden. Durch Verrechnung der prozentualen Anteile mit den Gesamtzellzahlen konnten die hier dargestellten absoluten B- und T-Zellzahlen ermittelt werden. Gezeigt sind die Werte von 8-14 Wochen alten Mäusen. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ;  $n = 20-40$ . Der schwarze Balken kennzeichnet den Mittelwert aller Datenpunkte pro Genotyp.

Die Milzen beider transgener Mauslinien wiesen erhöhte B- und T-Zellzahlen auf (Abb. 13), wobei diese in Relation zur Vergrößerung der Milzen standen. So zeigte sich für B- und T-Zellen in den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen eine stärkere Erhöhung der Zellzahlen als in den Milzen der CD30//CD4Cre-Mäuse.

### 3.1.4 Delokalisierung der T-Zellen in den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse

Um zu klären, ob die Splenomegalie der transgenen Mäuse zu Veränderungen in der Milzarchitektur führte, wurden Gefrierschnitte der Milzen angefertigt und histologisch untersucht. Hierzu wurden B-Zellen mit einem  $\alpha$ -IgM-Antikörper (rot), T-Zellen mit einem  $\alpha$ -CD3-Antikörper (hellblau) und die metallophilen Makrophagen, welche die innere Grenze des Marginalsinus markieren, mit einem  $\alpha$ -MOMA-Antikörper (dunkelblau) angefärbt. Im Follikel sind T-Zellen (hellblau) und follikuläre B-Zellen (rot) in getrennten Zonen lokalisiert.



**Abbildung 14: Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse weisen keine strikte Trennung von T- und B-Zellen auf.**

Milz-Gefrierschnitte von Kontrollmäusen (links), CD30//CD4Cre- (mitte), und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -IgM- (B-Zellen; rot),  $\alpha$ -CD3- (T-Zellen; hellblau) und  $\alpha$ -MOMA-Antikörper (metallophile Makrophagen im Marginalsinus; dunkelblau) gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus Analysen von mindestens fünf 8-14 Wochen alten Mäusen pro Genotyp. FoB = follikuläre B-Zellen, MM = metallophile Makrophagen. Maßstabsbalken = 250  $\mu$ m; 10  $\times$  Vergrößerung.

Die Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zeigten zwar noch organisierte Follikel, jedoch war eine Einwanderung von T-Zellen in die B-Zell-Zone zu erkennen, wohingegen bei den Milzen der CD30//CD4Cre-Mäuse keine Unterschiede in der Follikelstruktur im Vergleich zu Milzen von Kontrollmäusen vorhanden waren (Abb. 14).

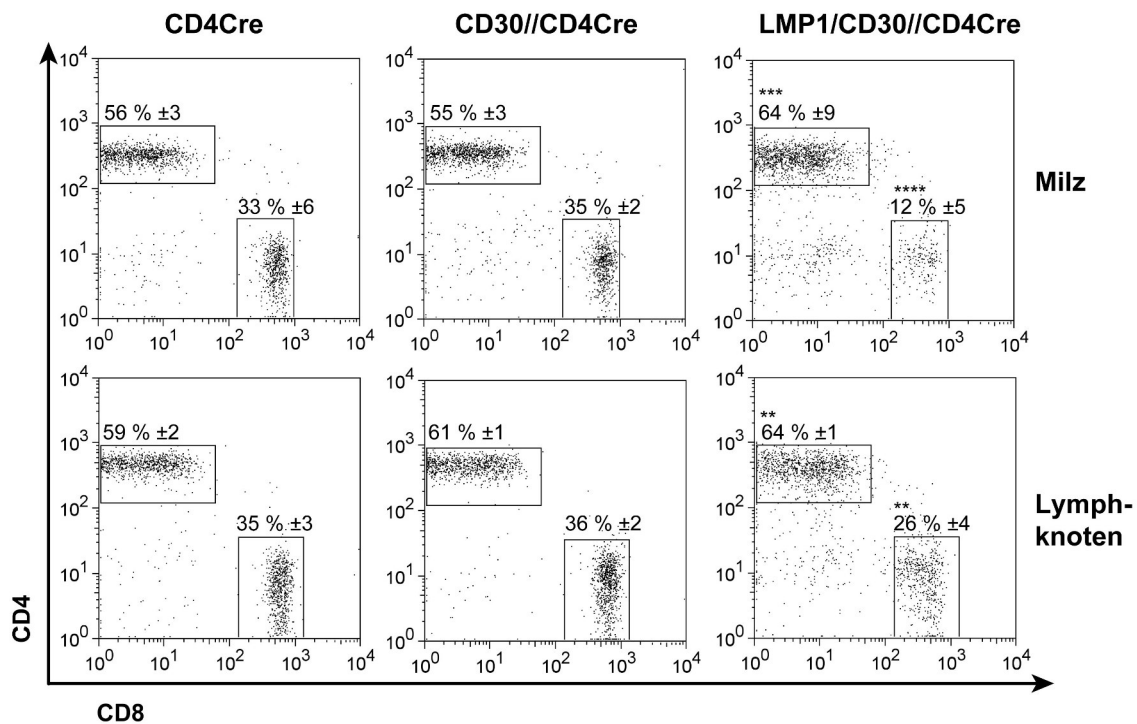
### 3.1.5 Konstitutiv aktive CD30-Signale in T-Zellen führen zur Verminderung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen

Um zu untersuchen, ob CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in gleichem Maße expandiert waren, wurden Milzzellen mit  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD4- und  $\alpha$ -CD8-Antikörpern gefärbt und mit Hilfe des Durchflusszytometers die prozentualen Anteile von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt.

Die prozentualen Anteile von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren in den Milzen der CD30//CD4Cre-Mäuse mit denen der Kontrollmäuse vergleichbar. In den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse war jedoch der prozentuale Anteil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich

geringer als in den Milzen der Kontrollmäuse, während der Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhöht war (Abb. 15, obere Reihe).

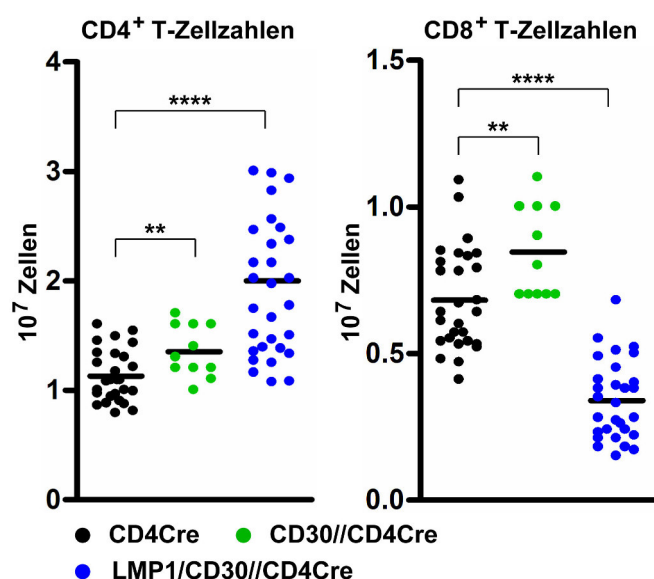
Um festzustellen, ob eine ähnliche Verschiebung zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch in den Lymphknoten zu beobachten war, wurden die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den inguinalen Lymphknoten bestimmt. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie in der Milz, bei CD30//CD4Cre-Mäusen waren für die prozentualen Anteile von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrollmäusen vorhanden. Bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen hingegen waren im Vergleich zu Kontrollmäusen auch in den Lymphknoten die Anteile von CD8<sup>+</sup> T-Zellen geringer, während die Anteile von CD4<sup>+</sup> T-Zellen leicht erhöht waren (Abb. 15, untere Reihe).



**Abbildung 15: Prozentuale Verteilung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Lymphknoten.**

Milzzellen (oben) und Lymphknotenzellen (unten) von Kontrollmäusen (links), CD30//CD4Cre-Mäusen (mitte) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD4- und  $\alpha$ -CD8-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Darstellung der prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Dot Plot bezieht sich auf CD3<sup>+</sup> Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis mit den Mittelwerten der prozentualen Anteile aus Analysen von 8-12 Wochen alten Mäusen für 4-10 Mäuse pro Genotyp. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse. \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001.

Da die LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse erhöhte T-Zellzahlen aufweisen, könnte es möglich sein, dass trotz des verminderten Anteils der CD8<sup>+</sup> T-Zellen die absoluten CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen mit denen von Kontrollmäusen vergleichbar waren. Um dies herauszufinden, wurden die absoluten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen in der Milz durch Verrechnung der prozentualen Anteile mit den absoluten T-Zellzahlen bestimmt.

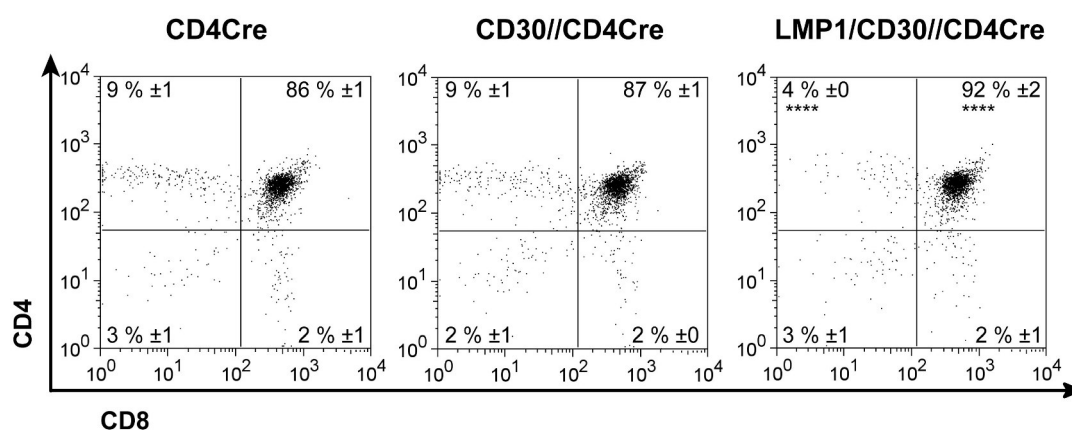


**Abbildung 16: Vergleich der absoluten Zellzahlen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz.**

Milzzellen von CD4Cre-Kontrollmäusen (schwarz), CD30//CD4Cre-Mäusen (grün) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden mit  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD4- und  $\alpha$ -CD8-Antikörpern gefärbt. Nach durchflusszytometrischer Analyse wurden die absoluten CD4<sup>+</sup> (links) und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen (rechts) durch Verrechnung mit den Gesamt-T-Zellzahlen bestimmt. Gezeigt sind die Werte von 8-14 Wochen alten Mäusen für 20-40 Mäuse pro Genotyp. \*\* P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,0001. Der schwarze Balken kennzeichnet den Mittelwert aller Datenpunkte pro Genotyp.

In den Milzen der CD30//CD4Cre-Mäuse waren die absoluten CD4<sup>+</sup>, ebenso wie die CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen, moderat erhöht, während in den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse eine starke Vermehrung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und eine deutliche Reduktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen vorlag (Abb. 16).

Um zu analysieren, ob die Reduktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die Expansion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen nur in der Peripherie stattfand, oder ob diese Verschiebung bereits während der T-Zellentwicklung im Thymus zu beobachten war, wurden die prozentualen Anteile von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus ermittelt.



**Abbildung 17: Vergleich der prozentualen Anteile der T-Zellen im Thymus.**

Thymuszellen von Kontrollmäusen (links), CD30//CD4Cre-Mäusen (mitte) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -CD4- und  $\alpha$ -CD8-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von doppelt-positiven, doppelt-negativen, sowie von einfach-positiven T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis mit den Mittelwerten der prozentualen Anteile aus Analysen von 8-12 Wochen alten Mäusen für 5-10 Mäuse pro Genotyp. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse. \*\*\*\* P < 0,0001.

Abbildung 17 zeigt die Verteilung von doppelt-negativen, doppelt-positiven und einfach-positiven T-Zellen im Thymus junger Mäuse. Während bei den CD30//CD4Cre-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der prozentualen Anteile der verschiedenen Populationen festgestellt werden konnte, zeigte sich bei den LMP1/CD30//CD4Cre Mäusen ein leicht erhöhter Prozentsatz an doppelpositiven T-Zellen, wohingegen der Anteil an einfach-positiven  $CD4^+$  Zellen vermindert war. Bei den einfach-positiven  $CD8^+$  Zellen war, wie auch bei den doppelt-negativen Zellen, kein Unterschied im Vergleich zu Kontrollmäusen erkennbar. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Reduktion der  $CD8^+$  T-Zellen, sowie die erhöhte Anzahl an  $CD4^+$  T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen nicht auf Veränderungen während der T-Zellentwicklung im Thymus zurückzuführen sind.

### **3.1.6 Konstitutive CD30-Signale führen zur verstärkten Expression von Gedächtnis-T-Zell-Markern**

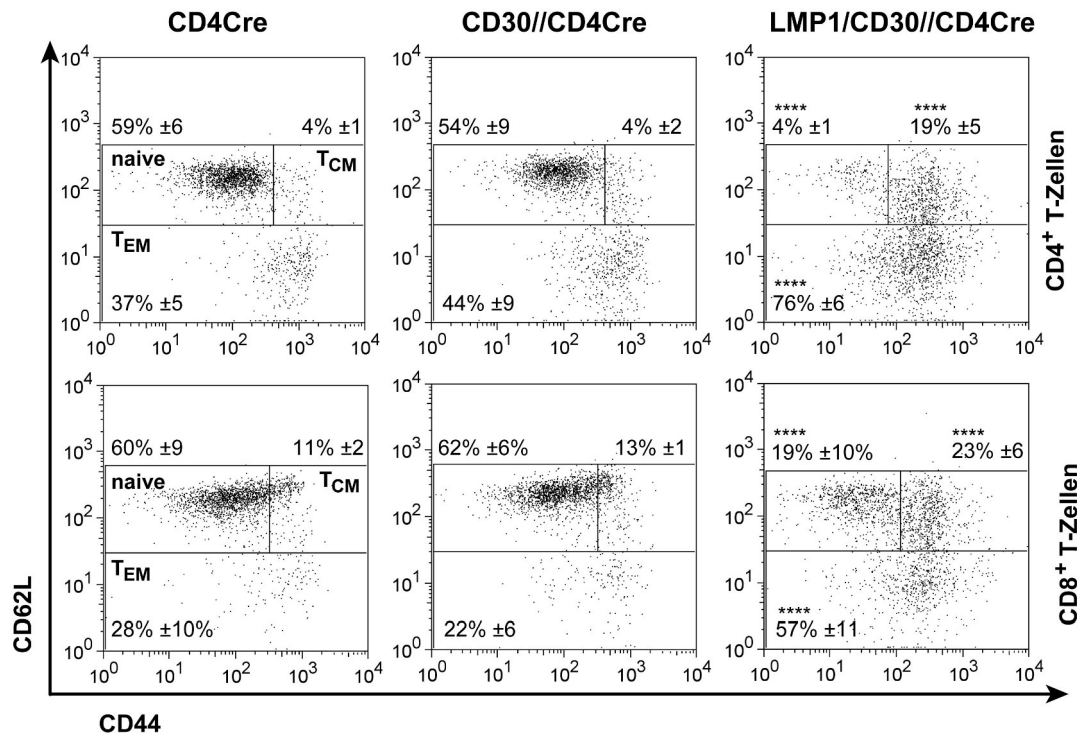
CD30-defiziente Mäuse zeigen eine gestörte sekundäre Immunantwort. Es wurde vermutet, dass dieser Phänotyp auf eine verminderte Bildung von  $CD4^+$  Gedächtnis-T-Zellen zurückzuführen ist (Gaspal et al., 2005). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass CD30-Signale in T-Zellen wichtig für die Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen sind.

Um herauszufinden, ob CD30-Signale Einfluss auf die Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen haben, wurde mithilfe durchflusszytometrischer Analysen die Verteilung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen in den Milzen der Mäuse bestimmt. Zur Unterscheidung von naiven T-Zellen, zentralen Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{CM}$ ) und Effektor-T-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ) wurden die Marker CD62L und CD44 verwendet.

Betrachtet man die Verteilung von Effektor-T-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ), zentralen T-Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ) und naiven T-Zellen in der Milz bezogen auf  $CD4^+$  T-Zellen, zeigte sich, dass das konstitutive CD30-Signal die Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen begünstigte. Der prozentuale Anteil von  $T_{EM}$  war bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen in etwa doppelt, der von  $T_{CM}$  ca. 5-mal so hoch wie bei Kontrollmäusen, während der Anteil naiver  $CD4^+$  T-Zellen stark reduziert war. Vergleicht man die Verteilung von naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse mit denen der Kontrollmäuse, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 18, obere Reihe).

Für die  $CD8^+$  T-Zellen (Abb. 18, untere Reihe) zeigte sich ein ähnliches Bild bezüglich der Verteilung von Gedächtnis-T-Zellen und naiven T-Zellen. Beide Gedächtnis-T-Zell-

populationen ( $T_{EM}$  und  $T_{CM}$ ) waren in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen deutlich erhöht, während der Anteil naiver  $CD8^+$  T-Zellen vermindert war. Bei den CD30//CD4Cre-Mäusen war wiederum kein signifikanter Unterschied, im Vergleich zu Kontrollmäusen, erkennbar.



**Abbildung 18: Verteilung von Gedächtnis-T-Zellen und naiven T-Zellen in der Milz.**

Milzzellen von Kontrollmäusen (links), CD30//CD4Cre-Mäusen (mitte) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD8-,  $\alpha$ -CD62L- und  $\alpha$ -CD44-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Verteilung von naiven T-Zellen, ( $CD62L^{hoch}$ ,  $CD44^{niedrig}$ ), zentralen T-Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ ) ( $CD62L^{hoch}$ ,  $CD44^{hoch}$ ) und Effektor-T-Gedächtniszellen ( $T_{EM}$ ) ( $CD62L^{niedrig}$ ,  $CD44^{hoch}$ ) in der Milz. Die prozentuale Verteilung bezieht sich auf  $CD3^+$  T-Zellen, wobei in der oberen Reihe  $CD4^+$  T-Zellen, in der unteren Reihe  $CD8^+$  T-Zellen gezeigt sind. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel mit den Mittelwerten der prozentualen Anteile von mindestens 5 Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

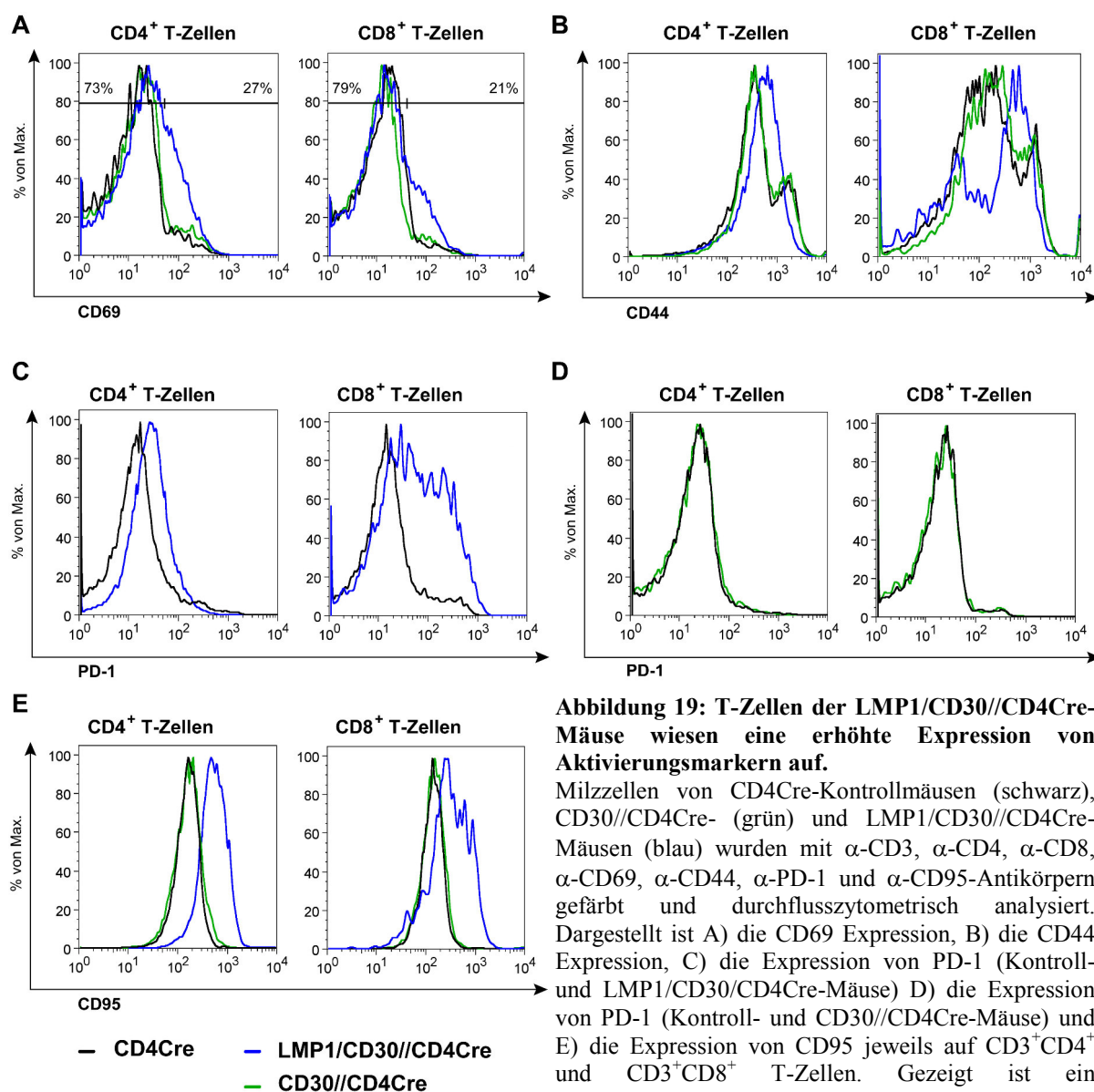
### 3.1.7 Das konstitutiv aktive CD30-Signal führt zur Expression von T-Zell-spezifischen Aktivierungsmarkern

Da das konstitutive CD30-Signal in den T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zu einer starken Verminderung von naiven T-Zellen und zur verstärkten Expression von Gedächtnis-T-Zell-Markern führte (Abb. 18), stellten wir uns die Frage, ob auch vermehrt aktivierte T-Zellen in diesen Mäusen vorhanden waren. Einige Oberflächenmoleküle, wie z.B. CD69, CD44, PD-1 und CD95, sind als Aktivierungsmarker für T-Zellen beschrieben. CD69 wird sehr schnell nach Aktivierung der T-Zellen transient hochreguliert. Auf naiven T-Zellen,  $T_{EM}$  und  $T_{CM}$  Zellen wird keine erhöhte CD69 Expression gefunden (Mueller et al., 2013; Sancho



et al., 2005). CD44 ist bei Mäusen nicht nur ein Marker für Gedächtnis-T-Zellen, sondern auch ein Marker für aktivierte T-Zellen. Werden naive T-Zellen während einer Infektion aktiviert, wird CD44 hochreguliert und verbleibt bei den sich nach der Bekämpfung der Infektion bildenden Gedächtnis-T-Zellen auf der Zelloberfläche (Baaten et al., 2010). Die Oberflächenmarker PD-1 und CD95 werden ebenfalls auf aktivierten T-Zellen verstärkt exprimiert (Baumler et al., 1996; Hokey et al., 2008; Sharpe et al., 2007).

Um zu untersuchen, ob eine Aktivierung der T-Zellen in den transgenen Mäusen vorlag, wurden T-Zellen aus der Milz von Kontrollmäusen, LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen und CD30//CD4Cre-Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression der Aktivierungsmarker CD69, CD44, PD-1 und CD95 hin untersucht.



**Abbildung 19: T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse wiesen eine erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern auf.**

Milzzellen von CD4Cre-Kontrollmäusen (schwarz), CD30//CD4Cre- (grün) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden mit  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD4,  $\alpha$ -CD8,  $\alpha$ -CD69,  $\alpha$ -CD44,  $\alpha$ -PD-1 und  $\alpha$ -CD95-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist A) die CD69 Expression, B) die CD44 Expression, C) die Expression von PD-1 (Kontroll- und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse) D) die Expression von PD-1 (Kontroll- und CD30//CD4Cre-Mäuse) und E) die Expression von CD95 jeweils auf CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel für mindestens zehn Mäuse pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen.

Auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse war keine erhöhte CD69-Expression im Vergleich zu Kontrollmäusen messbar. Bei den T-Zellen, die LMP1/CD30 exprimierten, konnte jedoch für die CD4<sup>+</sup>, wie auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Population mit erhöhter CD69 Expression detektiert werden (Abb. 19 A).

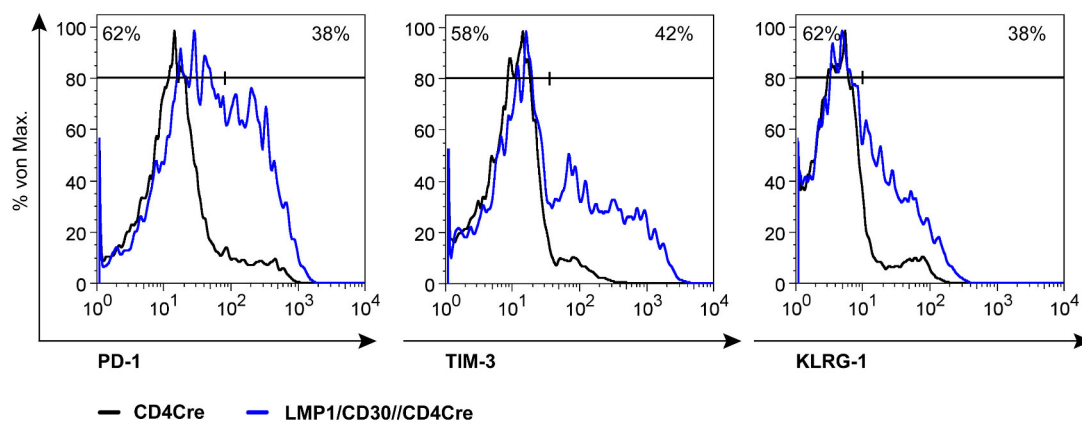
Abbildung 19 B zeigt die Expression von CD44 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Bei Kontrollmäusen, wie auch bei den CD30//CD4Cre-Mäusen grenzten sich deutlich zwei Populationen ab, eine CD44<sup>niedrig</sup> (naiven T-Zellen) und eine CD44<sup>hoch</sup> (aktivierte oder Gedächtnis-T-Zellen). Bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse waren diese zwei Populationen nicht zu erkennen, hier wiesen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine höhere Expression von CD44 im Vergleich zu naive T-Zellen, jedoch eine geringere CD44-Expression als die Gedächtnis-T-Zellpopulation der Kontrollmäuse auf. Bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse waren, wie bei den Kontrollmäusen, zwei Populationen erkennbar. Hierbei entsprach die CD44<sup>niedrig</sup>-Population wahrscheinlich dem Anteil an naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 19 B, rechts), während die CD44<sup>hoch</sup>-Population den Anteil aktivierter und Gedächtnis-T-Zellen widerspiegelt. Sowohl bei den CD4<sup>+</sup> als auch bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen war die CD44-Expression innerhalb der CD44<sup>hoch</sup>-Population etwas geringer als in Kontrollmäusen. Die Expression von PD-1 und CD95 war bei den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen erhöht (Abb. 19 C und E). Auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von CD30/CD4Cre- und Kontrollmäusen waren keine Unterschiede in der PD-1 und CD95-Expression erkennbar (Abb. 19 D und E).

Während das konstitutiv aktive CD30 Signal in T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zur Expression von Aktivierungs- und Gedächtnis-T-Zell-Markern führte, konnte dies bei den T-Zellen von CD30/CD4CreMäuse nicht festgestellt werden. Auch hinsichtlich dem Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Milzstruktur war bei den CD30/CD4Cre-Mäusen, im Gegensatz zu den LMP1/CD30//CD4Cre Mäusen, kein Unterschied im Vergleich zu Kontrollmäusen erkennbar. Aus diesem Grund wird in den nachfolgenden Kapiteln ausschließlich der Einfluss des Transgens LMP1/CD30 auf T-Zellen tiefergehend analysiert.



### 3.1.8 Das konstitutive CD30-Signal führt zur Entstehung von erschöpften CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Im Gegensatz zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen, in denen das konstitutive CD30-Signal wahrscheinlich eine Expansion der Zellen auslöste, führten konstitutive CD30-Signale in CD8<sup>+</sup> T-Zellen eher zur Depletion der Zellen (Abb. 15 und 16). Da sich die prozentualen Anteile von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Thymus von LMP1/CD30//CD4Cre- und von Kontrollmäusen nicht unterschieden (Abb. 17), musste die Verringerung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen stattfinden. Eine Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist oft bei chronischen Virusinfektionen zu beobachten, infolge der dauerhaften Stimulation der T-Zellen kommt es zu einer Erschöpfung oder der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser Erschöpfungszustand ist durch die Expression einiger inhibitorischer Rezeptoren charakterisiert (Jiang et al., 2015). Die wichtigsten Marker hierfür sind PD-1, TIM-3 und KLRG-1. Um zu untersuchen, ob das konstitutive CD30-Signal in CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu diesem Erschöpfungszustand führte, wurde die Expression dieser Marker auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht.



**Abbildung 20: Das konstitutive CD30-Signal führt in CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Expression typischer „Erschöpfungs“-Marker.**

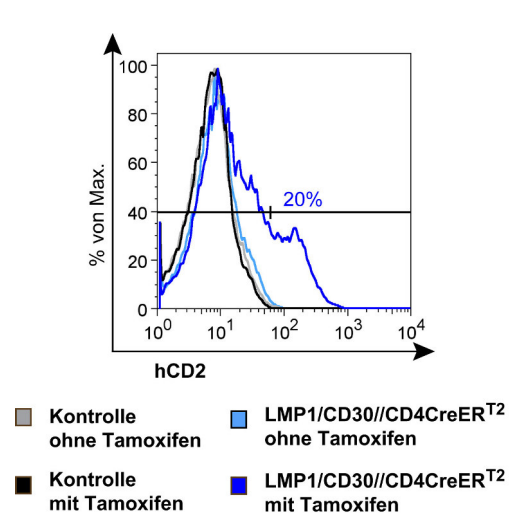
Milzzellen von Kontrollmäusen (schwarz) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden mit  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD8-,  $\alpha$ -PD-1-,  $\alpha$ -TIM-3- und  $\alpha$ -KLRG-1-Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der Expression von PD-1 (links), TIM-3 (mitte) und KLRG-1 (rechts) auf CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die gezeigten prozentualen Anteile beziehen sich auf die Expression der jeweiligen Marker auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse. Für die Expression von PD-1 (links) konnten zwei Populationen (PD-1<sup>mittel</sup> und PD-1<sup>hoch</sup>) detektiert werden. Der prozentuale Anteil zeigt nur die Zellen mit einer hohen PD-1-Expression, die charakteristisch für erschöpfte T-Zellen ist. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel. Es wurden mindestens acht Mäuse pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen analysiert.

Etwa 40 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zeigten eine sehr hohe Expression von PD-1 (Abb. 20, links). Das vermehrte Vorhandensein dieser CD8<sup>+</sup>-PD-1<sup>hoch</sup> T-Zellen deutete darauf hin, dass es sich hier um erschöpfte CD8<sup>+</sup> T-Zellen handelt. Diese Beobachtung wurde durch die Analyse der Marker TIM-3 und KLRG-1 (Abb. 20, mitte und

rechts) untermauert, denn auch hier war bei ca. 40 % der CD8<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse eine erhöhte Expression dieser beiden Marker vorhanden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die für den Erschöpfungszustand der CD8<sup>+</sup> T-Zellen charakteristischen Marker nicht auf allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse, sondern nur auf ca. 40 % exprimiert wurden. Die Induktion des Erschöpfungszustands in CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte für die verminderten CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen verantwortlich sein.

### 3.1.9 Die Expression der Aktivierungsmarker ist ein direkter Effekt von LMP1/CD30

Um zu analysieren, ob die Hochregulation der Aktivierungsmarker ein direkter Effekt des konstitutiven CD30-Signals war, wurden LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup>-Mäuse mit CD4CreER<sup>T2</sup>-Mäusen gekreuzt. Bei diesen Mäusen wird die Cre-Rekombinase erst durch Zugabe von Tamoxifen aktiviert. Im Gegensatz zu LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen, bei denen die Expression von LMP1/CD30 und des Reporters hCD2 sowohl in CD4<sup>+</sup>, als auch in CD8<sup>+</sup> T-Zellen stattfindet (Abb. 8), kann dies bei LMP1/CD30//CD4CreER<sup>T2</sup>-Mäusen nur in CD4<sup>+</sup> T-Zellen erreicht werden. Wie Vorarbeiten gezeigt haben, funktioniert die Induktion von Cre durch Tamoxifen und die nachfolgende Deletion der STOP-Kassette nur, wenn die Zellen gleichzeitig mit  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-Antikörpern stimuliert werden. Für die Analyse wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Milzen von LMP1/CD30//CD4CreER<sup>T2</sup>- und CD4CreER<sup>T2</sup>-Kontrollmäusen isoliert und vier Tage in Anwesenheit von  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-Antikörpern in Kultur genommen. Die Expression von LMP1/CD30 und des Reporters hCD2 wurde durch Zugabe von Tamoxifen induziert. Als Kontrolle wurde eine Kultivierung der Zellen ohne Tamoxifen im Medium durchgeführt. Nach vier Tagen wurde der prozentuale Anteil der hCD2 positiven Zellen unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt, um die Deletionseffizienz zu ermitteln.



**Abbildung 21: Das Reportermolekül hCD2 wird auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4CreERT<sup>2</sup>-Mäuse nach Zugabe von Tamoxifen exprimiert.**

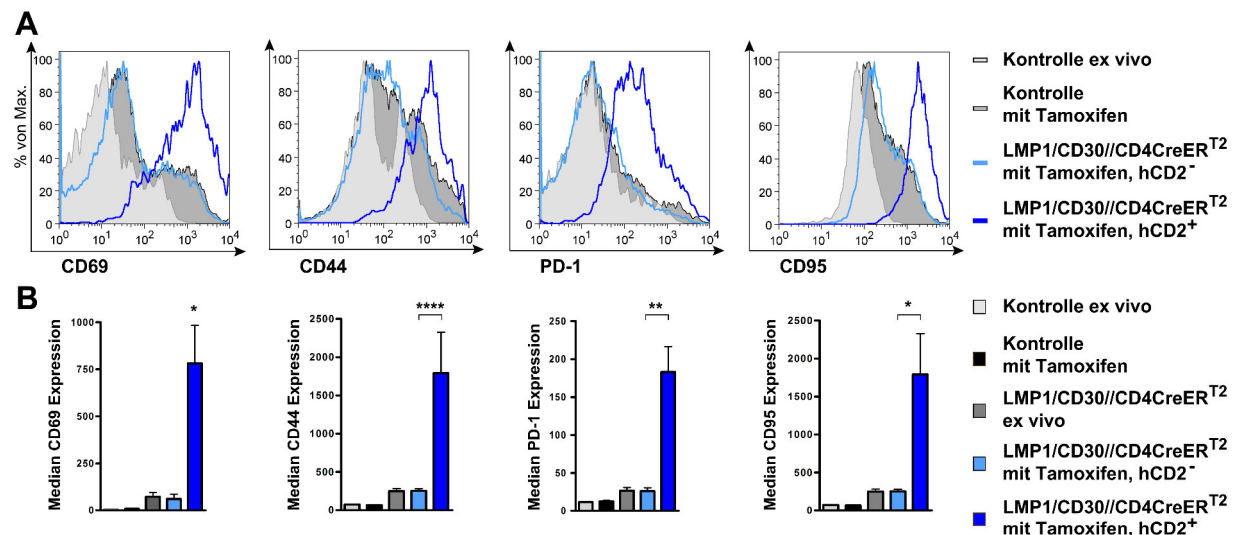
CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Milzen von CD4CreERT<sup>2</sup>- (Kontrollmäusen) und LMP1/CD30//CD4CreERT<sup>2</sup>-Mäusen isoliert und in Anwesenheit von  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-Antikörpern in Kultur genommen. Um die Expression von hCD2 zu induzieren, wurde dem Kultivierungsmedium Tamoxifen zugegeben. Die Kultivierung ohne Tamoxifen diente als zusätzliche Kontrolle. Nach vier Tagen wurden die Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse mit  $\alpha$ -CD4- und  $\alpha$ -hCD2-Antikörpern, und zur Bestimmung der lebenden Zellen mit TOPRO-3 gefärbt. Dargestellt ist die hCD2 Expression auf lebenden (TOPRO-3 negativen), CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel der Analyse von vier Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-12 Wochen.

Nach Zugabe von Tamoxifen konnte auf durchschnittlich 20 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4CreERT<sup>2</sup>-Mäuse das Reportermolekül hCD2 nachgewiesen werden. In CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD4CreERT<sup>2</sup>-Kontrollmäuse konnte unter diesen Bedingungen keine hCD2 Expression induziert werden. Bei Kultivierung der Zellen ohne Tamoxifen im Medium wurde hCD2 nicht exprimiert (Abb. 21).

Mithilfe dieses induzierbaren Systems wurde nun untersucht, ob es nach Induktion von LMP1/CD30 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls zur verstärkten Expression der untersuchten Aktivierungsmarker kommt. Hierfür wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Milzen von LMP1/CD30//CD4CreERT<sup>2</sup>- und CD4CreERT<sup>2</sup>-Mäusen isoliert und unter den gleichen Bedingungen wie zur Analyse der hCD2 Expression kultiviert. Nach Tamoxifenzugabe wurde die Expression der Aktivierungsmarker auf hCD2<sup>+</sup>LMP1/CD30<sup>+</sup>- und hCD2<sup>-</sup>LMP1/CD30<sup>-</sup>-Zellen verglichen.

Betrachtet man die Expressionsniveaus von CD69, CD44, PD-1 und CD95, so war kein Unterschied zwischen den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse und den hCD2<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4CreERT<sup>2</sup>-Mäuse feststellbar. Dagegen zeigten die hCD2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4CreERT<sup>2</sup>-Mäuse eine deutlich höhere Expression dieser Marker. Bei den frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse waren die Expressionslevel von CD69, CD44 und CD95 geringer als bei den in Kultur genommenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, dies ist sehr wahrscheinlich auf die Stimulation der Zellen mit  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-Antikörpern zurückzuführen (Abb. 22 A). Die Darstellung der Expressionslevel als Balkendiagramme veranschaulicht diese Ergebnisse (Abb. 22 B). Hier wurden zudem noch die Expression der untersuchten Marker auf frisch isolierten (ex vivo) CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4CreERT<sup>2</sup>-Mäuse mit einbezogen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass

bei den ex vivo  $CD4^+$  T-Zellen beider Genotypen die Expression von CD69, CD44, PD-1 und CD95 am geringsten war. Die Kultivierung und Stimulation der Zellen führte, wie erwartet, bereits zu einem Anstieg der Expressionslevel der Aktivierungsmarker. Die Expression dieser Marker war jedoch auf den  $hCD2^+CD4^+$  T-Zellen im Vergleich zu  $hCD2^-CD4^+$  Zellen, sowie zu  $CD4^+$  T-Zellen aus Kontrollmäusen, für alle untersuchten Marker signifikant erhöht (Abb. 22 B).



**Abbildung 22: Die Induktion konstitutiver CD30-Signale in  $CD4^+$  T-Zellen führt zur verstärkten Expression von CD69, CD44, PD-1 und CD95.**

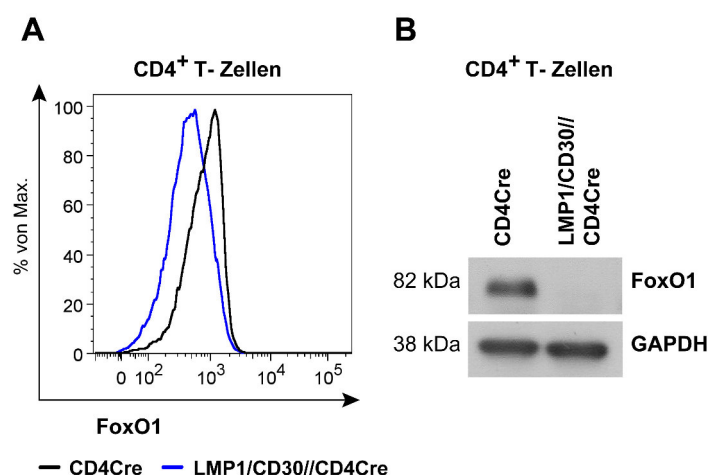
$CD4^+$  T-Zellen von Kontrollmäusen ( $CD4CreER^{T2}$ ) und LMP1/CD30//CD4CreER<sup>T2</sup>-Mäusen wurden wie in Abbildung 21 beschrieben kultiviert. Am Tag vier wurden die Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ - $hCD2^-$ ,  $\alpha$ -CD69-,  $\alpha$ -CD44-,  $\alpha$ -PD-1- und  $\alpha$ -CD95-Antikörpern und zur Bestimmung der lebenden Zellen mit TOPRO-3 gefärbt. Zusätzlich wurde die Analyse mit frisch entnommenen, nicht kultivierten  $CD4^+$  T-Zellen durchgeführt (ex vivo). Gezeigt sind die Expressionslevel von lebenden (TOPRO-3 negativen)  $CD4^+$  T-Zellen. A) Darstellung der Aktivierungsmarker-Expression im Histogramm und B) Darstellung der Mediane der Expressionslevel als Balkendiagramm. Die Histogramme zeigen jeweils ein repräsentatives Beispiel aus der Analyse von vier Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-12 Wochen. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ;  $n=4$ .

### 3.2 Die Aktivierung von Signalwegen durch den konstitutiv aktiven CD30-Rezeptor in murinen $CD4^+$ T-Zellen

Im nächsten Schritt wollten wir untersuchen, welche Signalwege durch das konstitutiv aktive CD30-Signal in murinen T-Zellen aktiviert werden. Die Analyse der Signalwege wurde nur mit  $CD4^+$  T-Zellen durchgeführt, da nach Isolierung der  $CD8^+$  T-Zellen aus den Milzen mittels magnetischer Zellseparation oft nicht genügend Zellen für eine ausreichende Proteingewinnung zur Verfügung standen.

### 3.2.1 Konstitutive CD30-Signale in T-Zellen führen durch Aktivierung des Akt-Signalweges zur Degradation von FoxO1

Wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt wurde, führte das konstitutive CD30-Signal zur verstärkten Expression von Aktivierungs- und Gedächtnis-T-Zell-Markern. Die Gruppe um M. Li konnte einen sehr ähnlichen Phänotyp in FoxO1-defizienten Mäusen zeigen. Das Fehlen des Transkriptionsfaktors FoxO1 in T-Zellen führte zu einer verminderten Anzahl von naiven T-Zellen, zu erhöhten Gedächtnis-T-Zellzahlen und zur spontanen T-Zellaktivierung (Ouyang et al., 2009). Um herauszufinden, ob verringerte FoxO1-Level für den T-Zellphänotyp in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen verantwortlich waren, wurden Milzzellen von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen mit  $\alpha$ -CD4- und intrazellulär mit  $\alpha$ -FoxO1-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die FoxO1-Level in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse waren geringer verglichen mit denen von Kontrollmäusen (Abb. 23 A). Um diese Daten zu bestätigen, wurden Gesamtproteine aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Milzen aus Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen präpariert und mittels Western-Blot analysiert. Während in Proteinextrakten von Kontrollmäusen FoxO1 detektiert werden konnte, war dies in CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse nicht der Fall (Abb. 23 B).

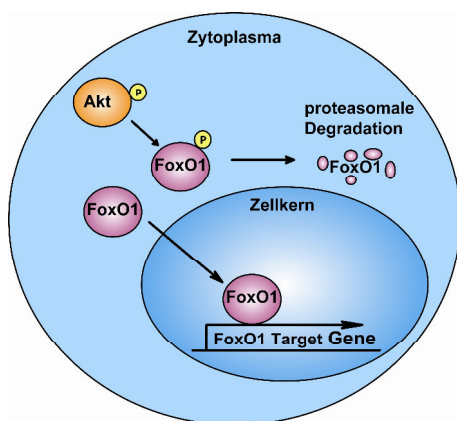


**Abbildung 23: Konstitutive CD30-Signale führen zur Degradation von FoxO1.**

A) Milzzellen von Kontrollmäusen (schwarz) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden mit  $\alpha$ -CD4- und intrazellulär mit  $\alpha$ -FoxO1-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist die Expression von FoxO1 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. B) Nachweis der Expression von FoxO1 von aus der Milz isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels Western-Blot-Analyse. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. Alle Ergebnisse wurden mit 8-14 Wochen alten Mäusen für mindestens fünf Mäuse pro Genotyp bestätigt.

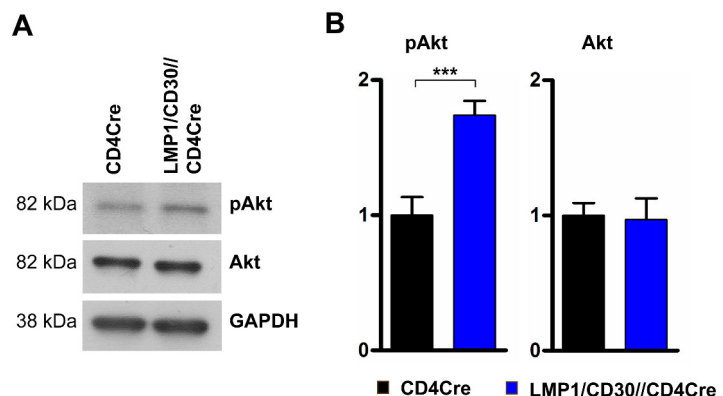
Die Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges ist als wichtigster Mechanismus zur Regulierung des FoxO1-Proteins bekannt. Akt wird durch die Phosphorylierung an Serin 473 aktiviert (Hemmings und Restuccia, 2012). Dies hat zur Folge, dass FoxO1 durch Akt phosphoryliert werden kann, was zur proteosomalen Degradation des FoxO1-Proteins im Zytoplasma führt. Werden FoxO1-Proteine nicht phosphoryliert, können sie in den Zellkern wandern und dort

als Transkriptionsfaktoren wirken (Abb. 24) (Martins et al., 2015; Peng, 2008; Tzivion et al., 2011). Da Akt als Hauptregulator für den Abbau von FoxO1 beschrieben wurde (Tzivion et al., 2011), und in den T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse das FoxO1-Protein nicht nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob FoxO1 durch eine verstärkte Akt-Aktivierung degradiert wurde. Aus Milzen von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und Proteinextrakte hergestellt. Mittels Western-Blot-Analysen wurden die Expressionslevel des Akt-Gesamtproteins und der phosphorylierten Form (Serin 473) von Akt (pAkt) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass pAkt verstärkt in den Proteinextrakten der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse vorhanden war, während das Akt-Gesamtprotein in gleicher Menge wie in den Proteinextrakten der Kontrollmäuse vorlag (Abb. 25 A). Die Quantifizierung mehrerer Western-Blot-Analysen ergaben durchschnittlich eine 1,7-fache Erhöhung von pAkt in CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen. Für Akt konnte auch nach Quantifizierung aller Western Blot Ergebnisse kein Unterschied gezeigt werden (Abb. 25 B).



**Abbildung 24: Vereinfachtes Schema der Regulation von FoxO1 durch Akt.**

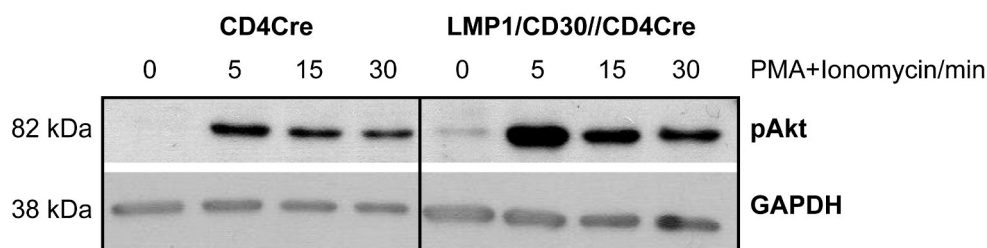
Die Phosphorylierung von FoxO1 durch aktiviertes Akt führt zum Abbau von FoxO1 im Zytosol. Wird FoxO1 nicht phosphoryliert, kann es in den Zellkern wandern und als Transkriptionsfaktor durch Bindung an die DNA zur Expression der FoxO1-Target Gene beitragen.



**Abbildung 25: LMP1/CD30 exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigen erhöhte pAkt Level.**

A) Aus Milzen von Kontrollmäusen (schwarz) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und Proteinextrakte gefertigt. Mittels Western-Blot-Analysen wurden die Level von Akt, sowie von phosphoryliertem (Serin 473) Akt untersucht. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. B) Die Quantifizierung der Western Blot Ergebnisse von pAkt und Akt erfolgte mit dem ImageJ-Programm. \*\*\*P < 0,001. Alle Analysen wurden mit sieben Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen durchgeführt.

In unstimulierten  $CD4^+$  T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse waren die basalen Level von pAkt erhöht. Um herauszufinden, ob sich durch Stimulierung der Zellen die Aktivität von Akt noch weiter steigern lässt, wurden  $CD4^+$  T-Zellen aus Milzen von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre Mäusen isoliert und für 5, 10, 15 und 30 min mit PMA (*Phorbol myristat acetat*) und Ionomycin stimuliert. Von den stimulierten und von unstimulierten  $CD4^+$  T-Zellen wurden Proteinextrakte hergestellt und diese, mittels Western-Blot-Analysen, auf die pAkt-Level hin untersucht.



**Abbildung 26: Die Stimulation von LMP1/CD30-exprimierenden  $CD4^+$  T-Zellen führt zu verstärkter Phosphorylierung von Akt.**

$CD4^+$  T-Zellen wurden aus Milzen von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen isoliert und mit PMA und Ionomycin über die angegebene Zeit (min) stimuliert. Anschließend wurden Proteinextrakte von den Zellen angefertigt und Western-Blot-Analysen unter Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers gegen pAkt durchgeführt. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus drei durchgeführten Experimenten. Die  $CD4^+$  T-Zellen wurden aus 8-14 Wochen alten Mäusen isoliert.

Die Stimulation der  $CD4^+$  T-Zellen beider Genotypen führte zur Aktivierung des Akt-Signalweges. Bei den  $CD4^+$  T-Zellen der Kontrollmäuse konnten nach 5 Minuten erhöhte Level von pAkt detektiert werden, welche über den weiteren Zeitverlauf (15 und 30 Minuten) langsam wieder abnahmen. Die gleiche Kinetik zeigte sich auch für die stimulierten  $CD4^+$  T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse. Hier waren jedoch die Mengen an phosphoryliertem Akt in der Zelle im Allgemeinen höher als in den  $CD4^+$  T-Zellen der Kontrollmäuse. Zwar ist pAkt schon in den unstimulierten  $CD4^+$  T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse erhöht, diese erhöhten Level können aber nicht die alleinige Ursache der drastisch erhöhten pAkt-Level nach Stimulation der Zellen im Vergleich zu den stimulierten  $CD4^+$  T-Zellen der Kontrollmäusen sein. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Kombination aus Stimulation und konstitutiven CD30-Signalen in  $CD4^+$  T-Zellen, im Vergleich zur Stimulation der Zellen ohne CD30-Signale, zu einer deutlich stärkeren Aktivierung des Akt Signalweges führten (Abb. 26).



### 3.2.2 Konstitutive CD30-Signale in CD4<sup>+</sup> T-Zellen führen zur Aktivierung der MAP-Kinasen Jnk und p38

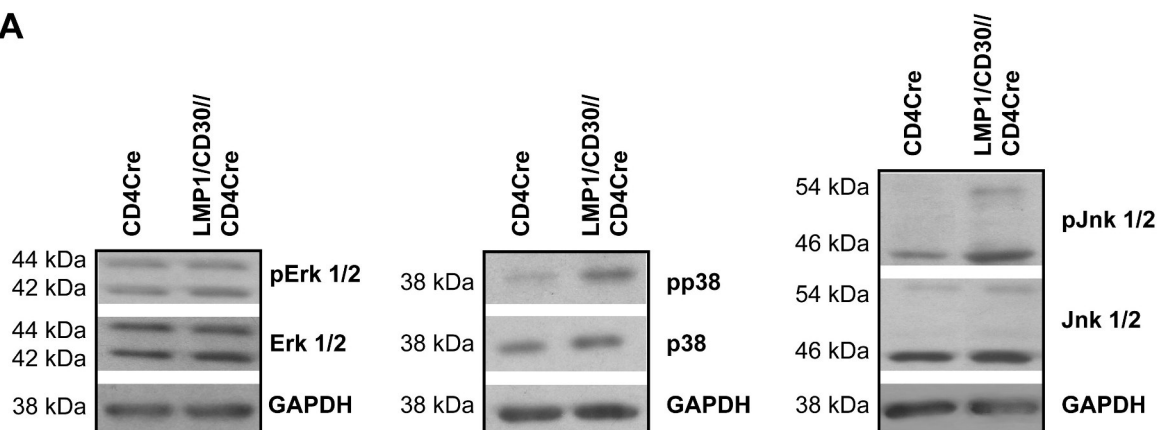
Zu den MAP (*Mitogen-activated protein*)-Kinasen werden die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1/2 (Erk1/2), p38 und die c-Jun-N-terminalen Kinasen 1/2/3 (Jnk1/2/3) gezählt. Durch Stimulierung eines Oberflächenrezeptors wird eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKK-Kinase) durch Phosphorylierung oder Interaktion mit einem GTP-bindenden Protein aktiviert, was zur Phosphorylierung einer MAP-Kinase-Kinase (MAPK-Kinase) führt. Die MAPK-Kinase aktiviert letztendlich durch Phosphorylierung die jeweilige MAP-Kinase (Erk1/2, Jnk1/2/3 oder p38). Die phosphorylierten MAP-Kinasen aktivieren durch Phosphorylierung u. a. Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern an DNA binden und somit die Transkription verschiedener Gene steuern (Pearson et al., 2001; Yang und Huang, 2015). Die Aktivierung der MAP-Kinasen durch CD30-Signale wurde bisher hauptsächlich in humanen ALCL-Zelllinien beschrieben. Abhängig von der verwendeten Zelllinie wurden jedoch unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht. Die Gruppe um R. Horie postulierte, dass Erk durch CD30-Signale aktiviert wird (Watanabe et al., 2005), während andere Gruppen zu dem Ergebnis kamen, dass CD30-Signale nur die MAP-Kinase p38, nicht aber Erk oder Jnk aktivieren (Krysov et al., 2007; Schneider et al., 2004). Auch die Aktivierung von Jnk durch CD30-Signale wurde bereits beschrieben (Toennies et al., 2004).

Um zu untersuchen, welche MAP-Kinasen in primären murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch das konstitutiv aktive CD30-Signal aktiviert werden, wurden aus Milzen von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und Proteinextrakte präpariert. Zur Detektion der phosphorylierten Formen der MAP-Kinasen im Western-Blot wurden spezifische Antikörper gegen die phosphorylierten Formen von Erk, p38 und Jnk verwendet. Die Ergebnisse der Western-Blot-Experimente zeigten, dass Erk nicht durch das konstitutive CD30-Signal aktiviert wird. Sowohl die phosphorylierte Form von Erk (pErk) als auch das Erk-Gesamtprotein waren in gleichen Mengen in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse und der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse vorhanden (Abb. 27 A, links, 27 B, links). Für die MAP-Kinasen p38 und Jnk konnte jedoch gezeigt werden, dass diese durch das konstitutiv aktive CD30-Signal aktiviert wurden. Die phosphorylierten Formen (pp38 und pJnk) waren in den Proteinextrakten von CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen vermehrt vorhanden, was bei den p38- und Jnk-Gesamtproteinen nicht der Fall war (Abb. 27 A, mitte und rechts). Die Quantifizierung mehrerer Western-Blots ergab, dass die pp38-Level in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse durchschnittlich 1,7-fach, die pJnk-Level durchschnittlich 3-mal so hoch waren, wie in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der

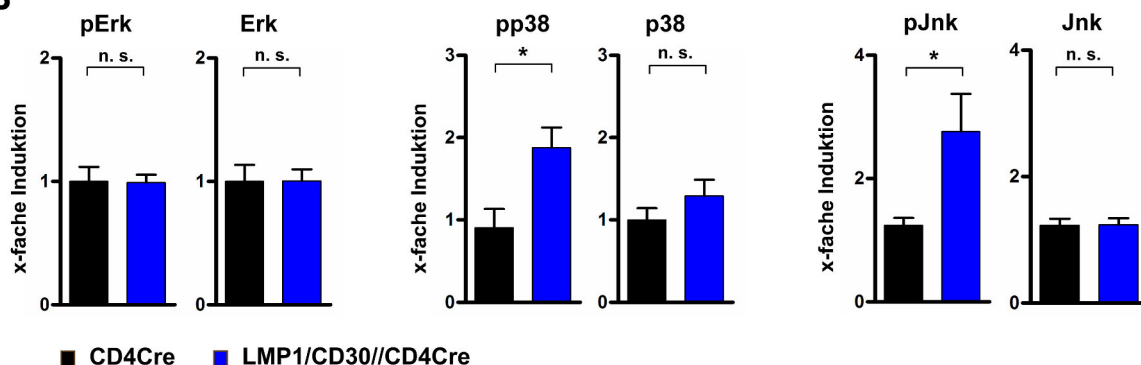


Kontrollmäuse (Abb. 27 B, mitte und links). Nach Quantifizierung der p38 Western-Blots wurde in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse eine geringfügige Erhöhung der p38-Level festgestellt, die aber nicht signifikant war (Abb. 27 B, mitte). Die Jnk-Level in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren in beiden Mauslinien auf dem gleichen Niveau (Abb. 27 B, rechts).

**A**



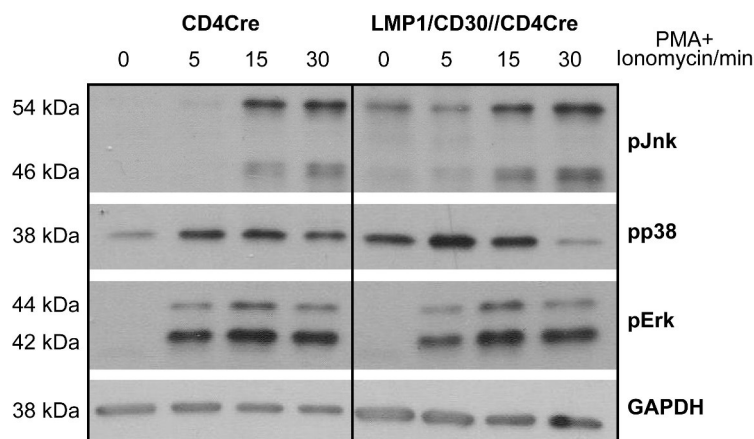
**B**



**Abbildung 27: Erhöhte Level von pp38 und pJnk in CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse.**

A) Aus Milzen von Kontrollmäusen (schwarz) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und Proteinextrakte angefertigt. Mittels Western-Blot-Analysen wurde die Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk, p38 und Jnk, sowie die Gesamtproteinmenge von Erk, p38 und Jnk untersucht. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. B) Die Quantifizierung der Western-Blot-Ergebnisse von pErk, pp38, pJnk, Erk, Jnk und p38 erfolgte mit dem ImageJ-Programm. \*P < 0,05; n.s. = nicht signifikant. Alle Analysen wurden mit vier bis acht Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen durchgeführt.

Um herauszufinden, ob durch CD30-Signale die Aktivität der MAP-Kinasen bei Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt oder inhibiert wird, wurden aus Milzen von Kontroll- und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und für 0, 5, 10, 15 und 30 Minuten mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Analyse der phosphorylierten Formen von Jnk, p38 und Erk erfolgte mittels Western-Blot.



**Abbildung 28: Die Aktivität der MAP-Kinasen wird nach Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch CD30-Signale nicht zusätzlich erhöht.**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Milzen von LMP1/CD30//CD4Cre- und Kontrollmäusen isoliert mit PMA und Ionomycin über die angegebene Zeit (min) stimuliert. Anschließend wurden Proteinextrakte von den Zellen angefertigt und Western-Blot-Analysen unter Verwendung von phosphospezifischen Antikörpern gegen pJnk, pp38 und pErk durchgeführt. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus drei durchgeführten Experimenten. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus 8-14 Wochen alten Mäusen isoliert.

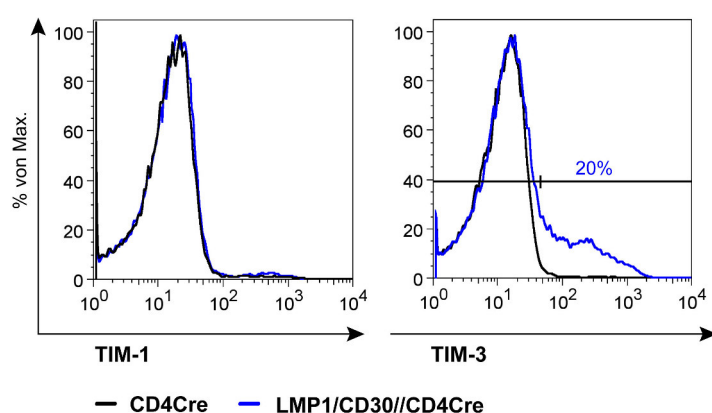
Durch Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte gezeigt werden, dass konstitutive CD30-Signale in Kombination mit einem Stimulus die Aktivität des Akt-Signalweges in CD4<sup>+</sup> T-Zellen noch weiter steigern (Abb. 26). Dies konnte für die MAP-Kinasen nicht beobachtet werden. In den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse konnten nach 15 und 30 Minuten erhöhte pJnk-Level detektiert werden, ähnlich hohe Level wurden auch bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse erreicht. Da nach Stimulation pJnk erst nach 15 Minuten detektiert werden konnte, sind die erhöhten Level von pJnk nach 5-minütiger Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse mit der allgemeinen verstärkten Aktivität des Jnk-Signalweges in unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen dieses Genotyps zu erklären. Auch für den p38-Signalweg konnte durch zusätzliche CD30-Signale bei der Stimulation keine drastische Steigerung der Aktivität im Vergleich zu stimulierten Kontroll-CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. Die pp38 Level waren in CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse nach 0,5 und 15 Minuten zwar höher als bei den Kontroll-CD4<sup>+</sup> T-Zellen, was wahrscheinlich durch die bereits erhöhte Aktivität des p38-Signalwegs in unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse verursacht wurde. Die Analyse von pErk nach Stimulation der Zellen ergab keine Unterschiede zwischen den CD4<sup>+</sup> T-Zellen beider Genotypen (Abb. 28).

### 3.3 Der Einfluss von konstitutiven CD30-Signalen auf die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

#### 3.3.1 Das konstitutive CD30-Signal fördert die Entstehung von T<sub>H</sub>1-Zellen

Wie bereits gezeigt wurde, weisen LMP1/CD30-exprimierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen aktivierten Phänotyp auf (Abb. 19 und 22). Jedoch ist noch nicht bekannt, ob der aktivierte Zustand der Zellen bereits zur Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte. Um herauszufinden, ob das konstitutive CD30-Signal Einfluss auf die Differenzierung in T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen hat, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Expression von T<sub>H</sub>1-, bzw. T<sub>H</sub>2-spezifischen Oberflächenmarkern hin untersucht.

Im Gegensatz zum Menschen wird auf murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Oberflächenmarker TIM-3 ausschließlich auf T<sub>H</sub>1-Zellen exprimiert (Ge et al., 2015; Hastings et al., 2009; Sabatos et al., 2003), während TIM-1 nach Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur auf T<sub>H</sub>2-Zellen, jedoch nicht auf T<sub>H</sub>1-Zellen exprimiert wird (Curtiss et al., 2012; Umetsu et al., 2005).

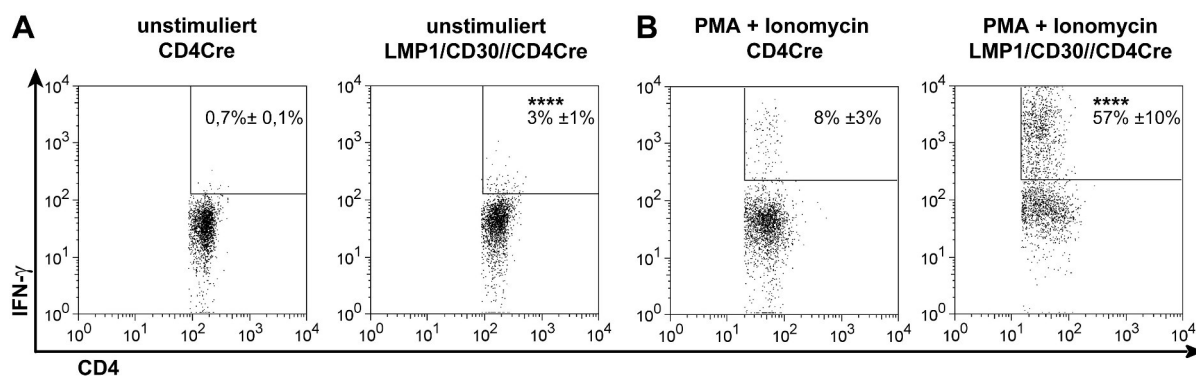


**Abbildung 29: Expression von TIM-1 und TIM-3 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Kontroll- und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen.**

Milzzellen von Kontrollmäusen (schwarz) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden mit  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD4,  $\alpha$ -TIM-1- und  $\alpha$ -TIM-3-Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind die Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der Expression von TIM-1 (links) und TIM-3 (rechts) auf CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus Analysen von mindestens fünf Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen.

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zeigten keine erhöhte Expression des T<sub>H</sub>2-Markers TIM-1 im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> Kontroll-T-Zellen (Abb. 29, links). Für den T<sub>H</sub>1-Marker TIM-3 hingegen, konnte auf durchschnittlich ca. 20 % der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse eine erhöhte Expression im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Kontrollmäusen nachgewiesen werden (Abb. 29, rechts). Dies deutete darauf hin, dass zumindest ein Teil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse bereits zu T<sub>H</sub>1-Zellen differenziert waren.

$T_H1$ -Zellen produzieren das Zytokin IFN- $\gamma$ . Das Vorhandensein dieser  $CD4^+TIM-3^+$  T-Zellpopulation führte deshalb zu der Frage, ob in LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen ein erhöhter Prozentsatz von IFN- $\gamma$  produzierenden  $CD4^+$  T-Zellen zu beobachten ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden Milzzellen in Kultur genommen und die T-Zellen durch Zugabe von PMA und Ionomycin aktiviert. Parallel wurden Zellen ohne Stimulus kultiviert. Nach sechs Stunden wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf ihre IFN- $\gamma$ -Expression hin untersucht.



**Abbildung 30: Das konstitutive CD30-Signal fördert die Entstehung von IFN- $\gamma$  produzierenden  $CD4^+$  T-Zellen.**

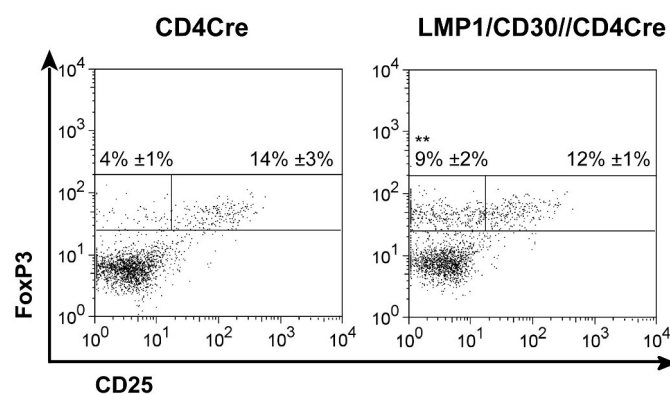
Milzzellen von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen wurden mit  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD4- und intrazellulär mit  $\alpha$ -IFN- $\gamma$ -Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile IFN- $\gamma$  produzierender  $CD4^+$  T-Zellen von A) unstimulierten und B) mit PMA und Ionomycin stimulierten  $CD4^+$  T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel mit den Mittelwerten der prozentualen Anteile aus Analysen von mindestens fünf Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

Ohne zusätzlichen Stimulus war der prozentuale Anteil von IFN- $\gamma$  produzierenden  $CD4^+$  T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse etwa 4-mal so hoch als der von Kontrollmäusen (Abb. 30 A). Nach Stimulierung der  $CD4^+$  T-Zellen mit PMA und Ionomycin war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt. Der prozentuale Anteil von IFN- $\gamma$  produzierenden  $CD4^+$  T-Zellen aus LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen war hier im Schnitt ca. 7-mal höher, verglichen mit Kontrollzellen (Abb. 30 B).

Die erhöhte Expression des  $T_H1$ -Markers TIM-3 und die gesteigerte IFN- $\gamma$  Produktion von unstimulierten LMP1/CD30-exprimierenden  $CD4^+$  T-Zellen wiesen darauf hin, dass das konstitutive CD30-Signal in  $CD4^+$  T-Zellen die Differenzierung zu  $T_H1$ -Zellen begünstigt.

### 3.3.2 Regulatorische T-Zellen sind in LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen vermehrt vorhanden

Regulatorische T-Zellen stellen eine weitere Subpopulation von T-Helferzellen dar. Bisher ist nicht bekannt, ob CD30-Signale die Entstehung von regulatorischen T-Zellen beeinflussen. Um herauszufinden, ob die T-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30 zu erhöhten Anteilen von regulatorischer T-Zellen führte, wurden Milzzellen mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD25 und intrazellulär mit  $\alpha$ -FoxP3-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.



**Abbildung 31: Erhöhte prozentuale Anteile von FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse.**

Milzzellen von Kontrollmäusen (links) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD25- und intrazellulär mit  $\alpha$ -FoxP3-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Darstellung im Dot Plot bezieht sich auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel mit den Mittelwerten der prozentualen Anteile aus Analysen von vier Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die Signifikanz bezieht sich auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse. \*\* P < 0,01.

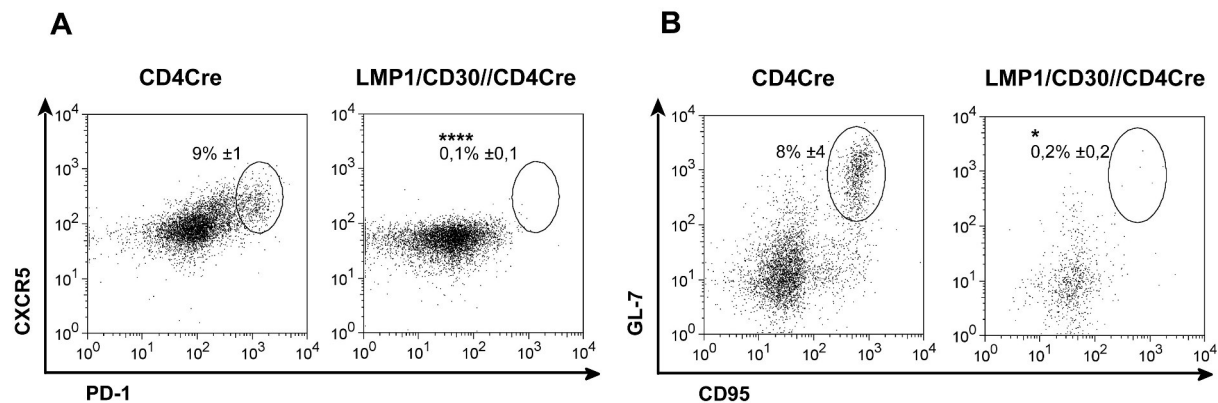
Wie Abbildung 31 zeigt, waren in den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse die prozentualen Anteile der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen erhöht, während die prozentualen Anteile der klassischen regulatorischen T-Zellen, die als FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> definiert sind, vergleichbar waren mit denen aus den Milzen der Kontrollmäuse.

Ob das konstitutive CD30-Signal für die erhöhten Anteile der CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen in den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse verantwortlich war, oder ob es sich hier um einen sekundären Effekt handelte, kann anhand dieser Analyse jedoch nicht geklärt werden.

### 3.3.3 Konstitutive CD30-Signale verhindern die Entstehung von follikulären T-Helferzellen in den Peyerschen Plaques

Eine weitere Subpopulation von T-Zellen sind die follikulären T-Helferzellen. Diese sind wichtig für die Bildung von Keimzentren und sind somit ein essentieller Teil der Immunantwort (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.2.2). In gesunden, unimmunisierten Mäusen sind follikuläre T-Helferzellen sowie Keimzentren nur in den Peyerschen Plaques im Darm vorhanden, da durch die große Anzahl von Darmbakterien eine ständige

Keimzentrumsreaktion stattfindet. Um herauszufinden, ob CD30-Signale Einfluss auf die Entstehung von follikulären T-Helferzellen haben, wurde der prozentuale Anteil der  $T_{FH}$ -Zellen sowie der Anteil der Keimzentrums-B-Zellen in den Peyerschen Plaques der Mäuse mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt.



**Abbildung 32: Durch das Fehlen von  $T_{FH}$ -Zellen in den Peyerschen Plaques der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse ist keine Keimzentrumsreaktion möglich.**

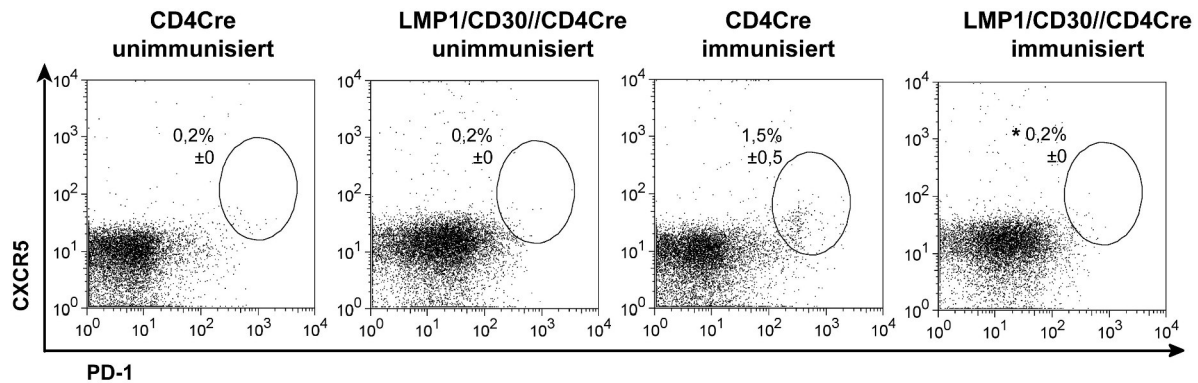
Aus den Peyerschen Plaques isolierte Zellen von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen wurden mit spezifischen Antikörpern für  $T_{FH}$ -Zellen und Keimzentrums-B-Zellen gefärbt und mit Hilfe durchflusszytometrischer Analyse die prozentualen Anteile dieser Zelltypen bestimmt. A) Um den Anteil von  $T_{FH}$ -Zellen ( $CD4^+$ ,  $PD-1^+$ ,  $CXCR5^+$ ) zu bestimmen, wurden die Zellen mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -PD-1- und  $\alpha$ -CXCR5-Antikörpern gefärbt. Dargestellt ist, bezogen auf  $CD4^+$  T-Zellen, der prozentuale Anteil von  $T_{FH}$ -Zellen ( $PD-1^+$ ,  $CXCR5^+$ ). B) Zur Detektion von Keimzentrums-B-Zellen wurden die Zellen mit  $\alpha$ -B220-,  $\alpha$ -CD95- und  $\alpha$ -GL-7-Antikörpern gefärbt. Dargestellt ist, bezogen auf  $B220^+$  B-Zellen, der prozentuale Anteil von Keimzentrums-B-Zellen ( $CD95^{hoch}$ ,  $GL-7^+$ ). Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel mit den Mittelwerten der prozentualen Anteile aus Analysen von vier Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse \*  $P < 0,05$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Wie erwartet konnten follikulären T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) in den Peyerschen Plaques der Kontrollmäuse detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren in den Peyerschen Plaques der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse keine follikulären T-Helferzellen zu finden (Abb. 32 A). Die gleiche Beobachtung galt für die Keimzentrums-B-Zellen. Während in den Peyerschen Plaques der Kontrollmäuse Keimzentrums-B-Zellen vorhanden waren, fehlten diese in den Peyerschen Plaques der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse (Abb. 32 B).

### 3.3.4 Die Rolle des konstitutiven CD30-Signals in T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse während der T-Zell-abhängigen Immunantwort

Die Ergebnisse aus Abbildung 32 führten zu der Fragestellung, ob die follikulären T-Helferzellen nur in den Peyerschen Plaques der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse fehlten, oder ob die Entstehung dieser Zellpopulation generell durch das konstitutive CD30-Signal inhibiert wurde. Um diese Frage zu beantworten, wurden LMP1/CD30//CD4Cre-, sowie

Kontrollmäuse mit Hühner-Gammaglobulin-konjugiertem Nitrophenylacetyl (NP-CGG), welches eine T-Zell-abhängige Immunantwort auslöst, immunisiert. Nach 14 Tagen wurde der Anteil der follikulären T-Helferzellen in der Milz ermittelt.



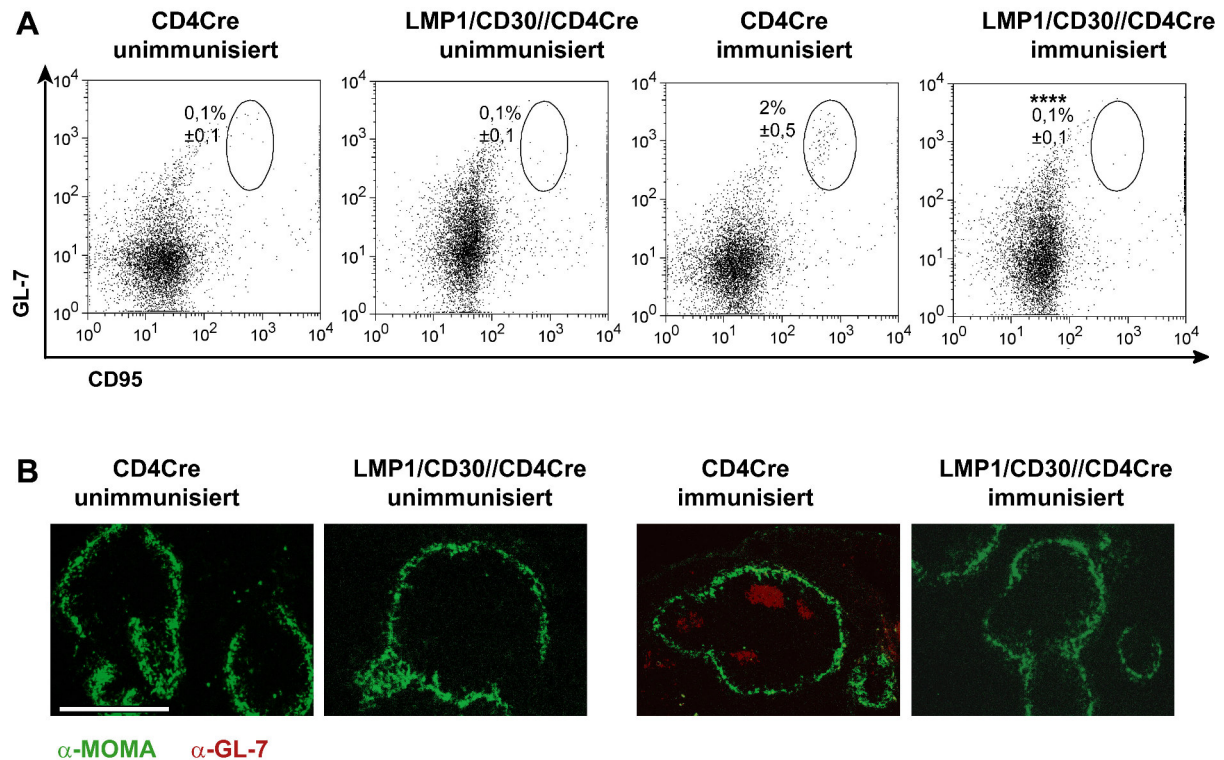
**Abbildung 33: Nach Immunisierung der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse mit einem T-Zell-abhängigen Antigen können keine  $T_{FH}$ -Zellen in der Milz nachgewiesen werden.**

Kontrollmäuse und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse wurden mit dem T-Zell-abhängigen Antigen (NP-CGG) immunisiert. Nach 14 Tagen wurden die Milzzellen mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CXCR5- und  $\alpha$ -PD-1-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch auf  $T_{FH}$ -Zellen ( $CXCR5^+$ ,  $PD-1^+$ ) hin untersucht. Die dargestellten Dot Plots beziehen sich auf  $CD4^+$  T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel mit den prozentualen Mittelwerten aus Analysen von mindestens fünf immunisierten und fünf unimmunisierten Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die Signifikanz bezieht sich auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse. \*  $P < 0,05$ .

In den Milzen unimmunisierter Mäuse waren, wie erwartet, keine follikulären T-Helferzellen zu finden (Abb. 33, links und mitte links). Zwei Wochen nach Immunisierung mit dem T-Zell-abhängigen Antigen NP-CGG konnten in den Milzen der Kontrollmäuse  $T_{FH}$ -Zellen nachgewiesen werden (Abb. 33, mitte rechts). Bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen konnten, auch nach T-Zell-abhängiger Immunisierung, keine follikulären T-Helferzellen in den Milzen der Mäuse detektiert werden (Abb. 33, rechts).

Da eine Immunisierung mit T-Zell-abhängigem Antigen zur Bildung von follikulären T-Helferzellen, und in Folge dessen, zur Ausbildung von Keimzentren führt, wurde ergänzend zur Analyse der follikulären T-Helferzellen auch noch die Entstehung von Keimzentren untersucht. Hierzu wurden 14 Tage nach Immunisierung der Mäuse mit NP-CGG die Anteile der Keimzentrums-B-Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Wie erwartet, waren in den Milzen der unimmunisierten Mäuse (Abb. 34 A, links und mitte links) keine Keimzentrums-B-Zellen zu finden. Nach Immunisierung zeigte sich bei den Kontrollmäusen eine  $CD95^+$   $GL7^+$  Keimzentrums-B-Zellpopulation, während in den Milzen der immunisierten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen keine Keimzentrums-B-Zellen vorhanden waren (Abb. 34 A, rechts und mitte rechts). Um diese Daten zu verifizieren, wurden zusätzlich von den Milzen der Mäuse Gefrierschnitte angefertigt, welche mit dem Keimzentrumsmarker GL-7 angefärbt wurden. Um die Follikel in den Milzen sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit

$\alpha$ -MOMA-Antikörper (metallophile Makrophagen im Marginalsinus) gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte nur bei den Milzschnitten der immunisierten Kontrollmäuse ein Signal für GL-7 detektiert werden (Abb. 34 B).

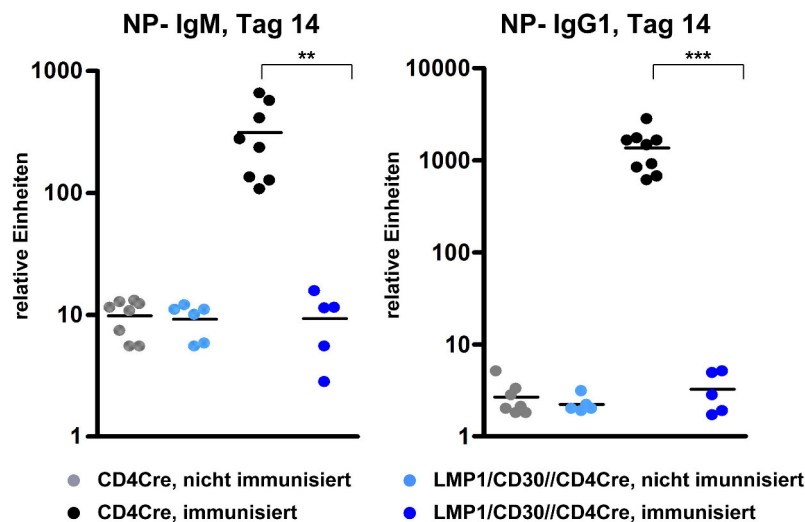


**Abbildung 34: LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse bilden nach T-Zell-abhängiger Immunisierung keine Keimzentren aus.**

Kontrollmäuse und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse wurden mit einem T-Zell-abhängigen Antigen (NP-CGG) immunisiert. A) Nach 14 Tagen wurden die Milzzellen mit  $\alpha$ -B220-,  $\alpha$ -CD95- und  $\alpha$ -GL-7-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch auf Keimzentrums-B-Zellen (CD95<sup>hoch</sup>, GL-7<sup>+</sup>) hin untersucht. Die dargestellten Dot Plots beziehen sich auf B220<sup>+</sup> B-Zellen. B) Nach 14 Tagen wurden Gefrierschnitte von Milzen der Mäuse angefertigt. Zum histologischen Nachweis von Keimzentrums-B-Zellen wurden die Schnitte mit  $\alpha$ -MOMA- (metallophile Makrophagen) und  $\alpha$ -GL-7-Antikörper (Keimzentrums-B-Zellen) gefärbt. Maßstabsbalken = 250  $\mu$ m; 10  $\times$  Vergrößerung. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel mit den Mittelwerten aus Analysen von mindestens fünf immunisierten und fünf unimmunisierten Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die Signifikanz bezieht sich auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse. \*\*\*\*  $P < 0,001$ .

Um abschließend zu zeigen, dass in den LMP1/CD30//CD4Cre Mäusen keine T-Zell-abhängige Immunantwort möglich ist, wurden die Antigen-spezifischen NP-Antikörper im Serum der Mäuse bestimmt. Da bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort hauptsächlich die Bildung von Antikörpern des IgM- und IgG1-Isotyps stattfindet, wurden mittels ELISA die Titer von NP-spezifischen IgM- und IgG1-Antikörpern bestimmt.





**Abbildung 35: Seren von LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen weisen nach T-Zell-abhängiger Immunisierung keine Antigen-spezifischen IgM- und IgG1-Titer auf.**

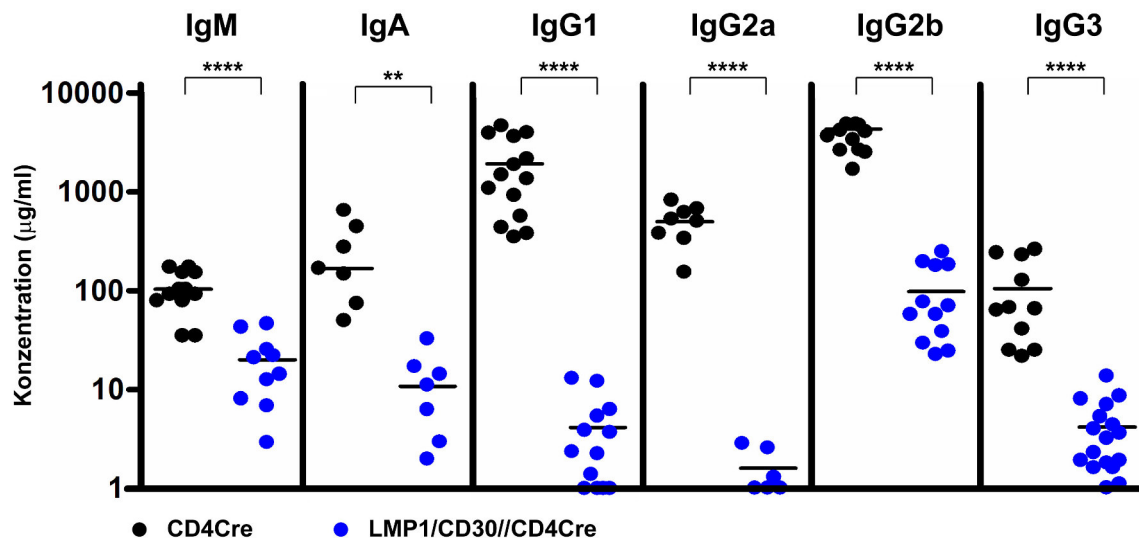
NP-spezifische Antikörpertiter aus Seren von LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen und Kontrollmäusen wurden 14 Tage nach T-Zell-abhängiger Immunisierung mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind relative Einheiten von NP-IgM (links) und NP-IgG1 (rechts). Der schwarze Balken kennzeichnet den Durchschnittswert. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n = 5-9$ .

Die Auswertung der ELISA Daten ergab, dass im Serum der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse weder NP-spezifische IgM-, noch NP-spezifische IgG1-Antikörper vorhanden waren. Die errechneten Antikörperkonzentrationen befanden sich auf dem Niveau der unimmunisierten Mäuse, in deren Serum sich keine NP-spezifischen Antikörper befinden können und daher als Negativkontrolle dienten. Bei den immunisierten Kontrollmäusen waren sowohl NP-spezifische IgM-, wie auch NP-spezifische IgG1-Antikörper detektierbar (Abb. 35).

### 3.4 LMP1/CD30 exprimierende T-Zellen haben einen Einfluss auf die B-Zellen

#### 3.4.1 Die Antikörpertiter sind im Blut der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse stark vermindert

Da, wie in Kapitel 3.3.3 und 3.3.4 gezeigt wurde, in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen sowohl die Immunantwort in den Peyerschen Plaques, als auch nach T-Zell-abhängiger Immunisierung stark beeinträchtigt war, wurde untersucht, welche Auswirkung dies auf die Antikörpertiter in unimmunisierten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen hatte. Hierfür wurden mittels ELISA die Konzentrationen der Immunglobulin-Isotypen IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 bestimmt.



**Abbildung 36: Stark erniedrigte Titer verschiedener Immunglobulin-Isotypen im Serum von LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen.**

Dargestellt sind die Konzentrationen (µg/ml) der Immunglobuline IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, und IgG3 im Serum von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen. Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte mittels ELISA. Analysiert wurden 6-17 Mäuse pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Mittelwerte. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

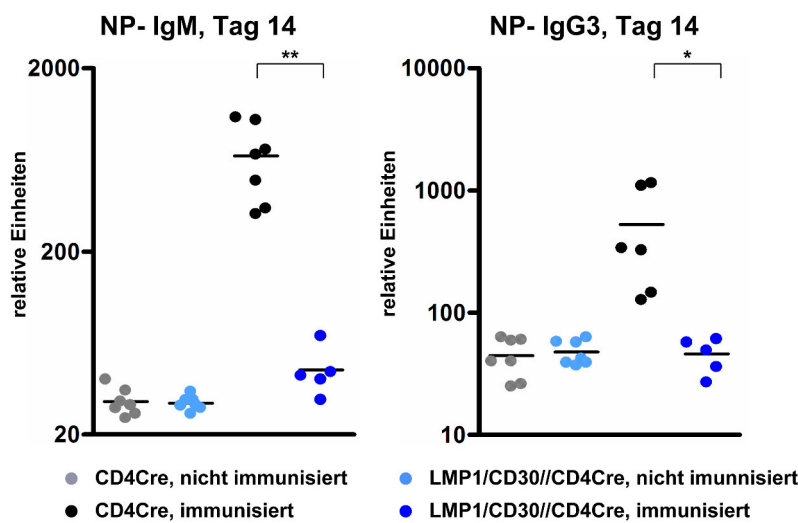
Die Konzentrationen aller untersuchten Immunglobulin-Isotypen in Seren der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse waren im Vergleich zu Seren von Kontrollmäusen signifikant erniedrigt. Während die durchschnittliche Konzentration der IgM-Titer nur leicht unter dem Wert von Kontrollmäusen lag, waren die IgA-, IgG1-, IgG2a-, IgG2b- und IgG3-Antikörper stark reduziert (Abb. 36).

Da die Antikörperproduktion der B-Zellen in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen so stark eingeschränkt war, wollten wir untersuchen, ob in diesen Mäusen eine T-Zell-unabhängige Immunantwort möglich ist.

### 3.4.2 Der Einfluss des konstitutiven CD30-Signals in T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse auf die T-Zell-unabhängige Immunantwort

T-Zell-unabhängige Antigene sind meist Polysaccharide, die über Toll-like Rezeptoren B-Zellen direkt aktivieren. B-Zellen können so, ohne dass eine Interaktion mit T-Zellen nötig ist, Antigen-spezifische Antikörper produzieren (Hanihara-Tatsuzawa et al., 2014; Obukhanych und Nussenzweig, 2006). Um herauszufinden, ob in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen eine T-Zell-unabhängige Immunantwort erfolgen kann, wurden die Mäuse mit dem T-Zell-unabhängigen Antigen Ficoll, welches an Nitrophenylacetyl (NP) gekoppelt war, immunisiert, und nach 14 Tagen die NP-spezifischen Antikörper im Serum der Mäuse bestimmt. Da bei der T-Zell-unabhängigen Immunantwort hauptsächlich die Bildung von

Antikörpern des IgM- und IgG3-Isotyps stattfindet, wurden mittels ELISA die Titer von NP-spezifischen IgM- und IgG3-Antikörpern bestimmt.



**Abbildung 37: Nach T-Zell-unabhängiger Immunisierung sind in Seren der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse die Antigen-spezifischen IgM- und IgG3-Titer stark reduziert.**

NP-spezifische Antikörpertiter in Seren von LMP1/CD30//CD4Cre- und Kontrollmäusen wurden 14 Tage nach T-Zell-unabhängiger Immunisierung mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind relative Einheiten von NP-IgM (links) und NP-IgG3 (rechts). Der schwarze Balken kennzeichnet den Durchschnittswert. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; n = 5-7.

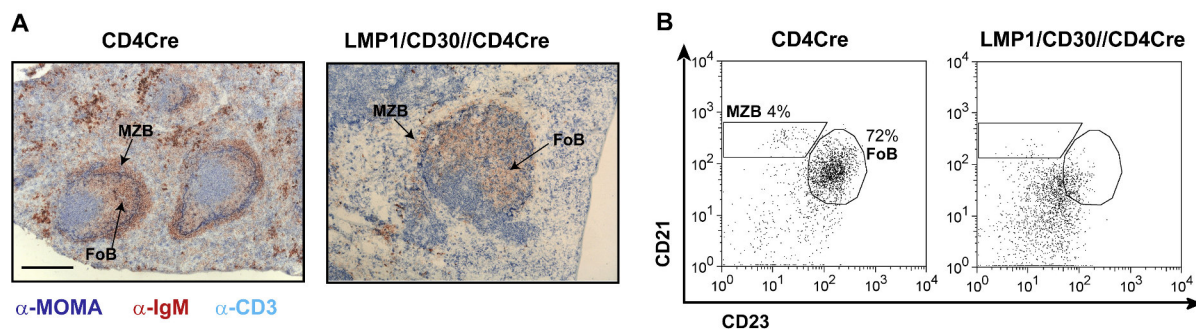
Obwohl nach T-Zell-unabhängiger Immunisierung der Mäuse die Immunantwort ohne Beteiligung der T-Zellen stattfindet, waren im Serum der immunisierten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse die NP-spezifischen Antikörper stark reduziert. NP-spezifische IgM-Antikörper waren nur in geringen Mengen vorhanden (Abb. 37, links). NP-spezifische IgG3-Antikörper konnten im Serum der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse nicht detektiert werden. Die im ELISA ermittelten Werte lagen auf dem gleichen Niveau wie die der unimmunisierten Mäuse, welche als Negativkontrolle dienten (Abb. 37, rechts).

### 3.4.3 Veränderungen bei den Marginalzonen-B-Zell- und B1-Zellpopulationen in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen

Die T-Zell-unabhängige Immunantwort wird hauptsächlich von Marginalzonen B-Zellen und B1-Zellen durchgeführt (Baumgarth, 2011; Cerutti et al., 2013; Martin et al., 2001). Um zu untersuchen, ob die erniedrigten Antikörpertiter (Abb. 36), sowie die fehlende Immunantwort auf T-Zell-unabhängige Antigene in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (Abb. 37) auf Veränderungen bezüglich der Marginalzonen-B-Zellen und B1-Zellpopulationen zurückzuführen waren, wurden die Anteile dieser Zellpopulationen in Kontroll- und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Erste Hinweise auf Veränderungen der Marginalzonen-B-Zellen lieferten bereits die histologischen Untersuchungen der Milzen (Abb. 14, hier nochmals als Abb. 38 A gezeigt). Bei genauer

Betrachtung konnte festgestellt werden, dass bei den Milzschnitten der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse nur sehr wenige Marginalzonen-B-Zellen vorhanden waren (Abb. 38 A, rechts), während diese bei den Milzschnitten der Kontrollmäuse deutlich erkennbar waren (Abb. 38 A, links).

Anhand der Expression der Oberflächenmarker CD21 und CD23 können Marginalzonen-B-Zellen ( $B220^+$ ,  $CD21^+$ ,  $CD23^{\text{niedrig}}$ ) und folliculäre B-Zellen ( $B220^+$ ,  $CD21^{\text{mittel}}$ ,  $CD23^+$ ) unterschieden werden. Nach durchflusszytometrischer Analyse der Milzzellen von Kontrollmäusen waren Marginalzonen-B-Zellen und folliculäre B-Zellen als klar definierte Zellpopulationen erkennbar. Da die gesamte B-Zellpopulation der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse eine verminderte Expression von CD21 und CD23 zeigte, war hier eine klare Auftrennung zwischen den beiden B-Zellpopulationen nicht mehr möglich (Abb. 38 B).

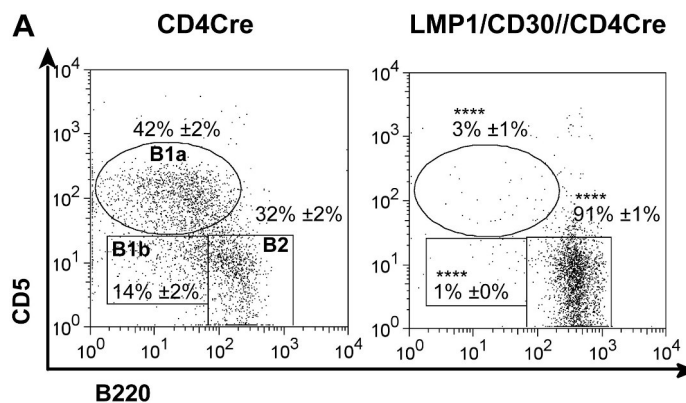


**Abbildung 38: LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse weisen Veränderungen in den Marginalzonen-B-Zell- und der folliculären B-Zellpopulation auf.**

A) Gefrierschnitte von Milzen von Kontrollmäusen (links) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -IgM- (B-Zellen; rot),  $\alpha$ -CD3- (T-Zellen; hellblau) und  $\alpha$ -MOMA-Antikörpern (metallophile Makrophagen, dunkelblau) gefärbt. Maßstabsbalken = 250  $\mu$ m; 10  $\times$  Vergrößerung. B) Milzzellen von Kontrollmäusen (links) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -B220-,  $\alpha$ -CD23- und  $\alpha$ -CD21-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Anteile von Marginalzonen-B-Zellen ( $CD23^{\text{niedrig}}$ ,  $CD21^+$ ) und folliculären B-Zellen ( $CD21^{\text{mittel}}$ ,  $CD23^+$ ). Die Dot Plots beziehen sich auf  $B220^+$  Zellen. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel. Alle Experimente wurden mit mindestens 5 Mäusen pro Genotyp mit 8-14 Wochen alten Mäusen bestätigt. FoB = folliculäre B-Zellen, MZB = Marginalzonen-B-Zellen.

Die durchflusszytometrische Analyse der B1-Zellen wurde mit Zellen aus dem Bauchraum der Mäuse durchgeführt, da sich diese B-Zellpopulation hauptsächlich dort befindet. B1-Zellen können von B2-Zellen (Marginalzonen-B-Zellen und folliculäre B-Zellen) anhand der Expression von Oberflächenmolekülen unterschieden werden. B1-Zellen exprimieren, im Gegensatz zu B2-Zellen, nur geringe Level von B220. Des Weiteren werden murine B1-Zellen in zwei Subpopulationen gegliedert, in die B1a- und in die B1b-Zellen, welche sich anhand der Expression von CD5 unterscheiden. B1-Zellen sind, wie auch Marginalzonen-B-Zellen, an T-Zell-unabhängigen Immunantworten beteiligt (Aziz et al., 2015; Baumgarth, 2011). Die prozentualen Anteile von B1a- und B1b-Zellen waren im Bauchraum der

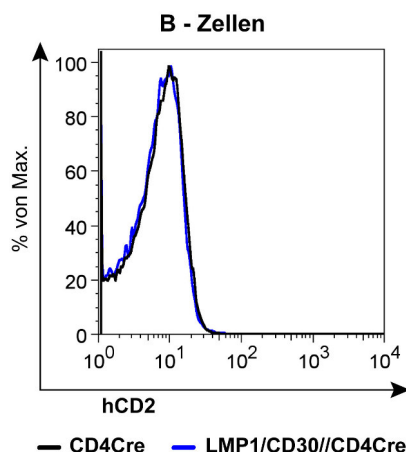
LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse, im Vergleich zu Kontrollmäusen, um ca. das zehnfache reduziert. Der Anteil von B2-Zellen lag in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen bei ca. 90 %, während bei den Kontrollmäusen nur ca. 30 % der B-Zellen im Bauchraum B2-Zellen waren (Abb. 39).



**Abbildung 39: Stark verminderte Anteile von B1-Zellen im Bauchraum der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse.**

Zellen aus dem Bauchraum von Kontrollmäusen (links) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -IgM-,  $\alpha$ -B220- und  $\alpha$ -CD5-Antikörpern gefärbt und mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht. Die Dot Plots zeigen die B220 und CD5 Expression auf IgM<sup>+</sup> Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel mit den prozentualen Mittelwerten aus Analysen von mindestens fünf Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse. \*\*\*\* P < 0,0001.

Diese drastische Beeinflussung der B-Zellen durch die LMP1/CD30-exprimierenden T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse war ein erstaunliches Ergebnis. Um zu verifizieren, dass durch Kreuzung mit CD4Cre-Mäusen das Zielprotein nur auf T- und nicht auf B-Zellen exprimiert wurde, wurden die B-Zellen der transgenen Mäuse auf die Expression des Reporters hCD2 hin untersucht.



**Abbildung 40: Die B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse exprimieren kein hCD2.**

Milzzellen von Kontrollmäusen (schwarz) und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen (blau) wurden mit  $\alpha$ -B220- und  $\alpha$ -hCD2-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die hCD2 Expression auf B220<sup>+</sup> B-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus Analysen von mindestens 10 Mäusen pro Genotyp.

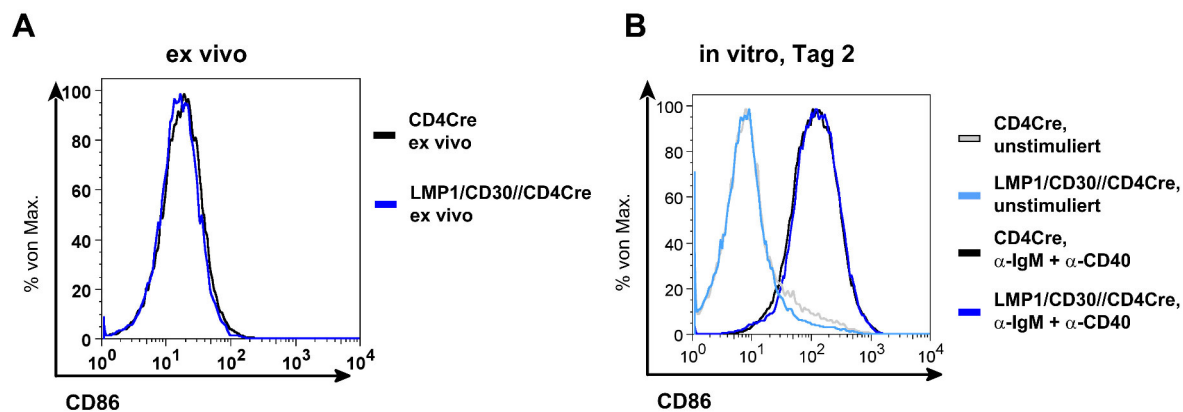
Abbildung 40 zeigt, dass der Reporter hCD2 nicht auf B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse exprimiert wurde. Somit mussten die Veränderungen bezüglich der verschiedenen B-Zelltypen in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen auf die LMP1/CD30-exprimierenden T-Zellen zurückzuführen sein, und nicht auf einen intrinsischen B-Zelleffekt beruhen.

### **3.4.4 B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zeigen in vitro keine Veränderungen hinsichtlich Aktivierung und Differenzierung**

Die B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse produzierten wahrscheinlich wegen der verminderten Anzahl von Marginalzonen-B-Zellen und B1-Zellen nur sehr wenige Antikörper (Abb. 36). Auch waren sie nicht in der Lage, nach T-Zell-unabhängiger Immunisierung Antigen-spezifische Antikörper zu bilden (Abb. 37). Um zu bestätigen, dass diese Veränderungen der B-Zellen in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen durch die LMP1/CD30-exprimierenden T-Zellen ausgelöst wurde, wurden B-Zellen aus den Milzen der Mäuse isoliert und in vitro analysiert.

Um zu untersuchen, ob sich die B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse hinsichtlich des Aktivierungspotentials von B-Zellen aus Kontrollmäusen unterscheiden, wurden B-Zellen beider Genotypen für zwei Tage in Kultur genommen. Dem Medium wurden, zur Stimulation der B-Zellen,  $\alpha$ -IgM- und  $\alpha$ -CD40-Antikörper zugegeben. Am Tag zwei wurde anhand des für B-Zellen spezifischen Aktivierungsmarkers CD86 mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht, ob sich die isolierten B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse aktivieren ließen. Um auszuschließen, dass die B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse in vivo bereits aktiviert waren, wurde auch die CD86 Expression auf frisch isolierten Milzzellen bestimmt. Die Expressionlevel von CD86 auf den B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre und der Kontrollmäuse waren direkt nach Isolation auf gleichem Niveau (Abb. 41 A). Dies wies darauf hin, dass die B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse in vivo nicht konstitutiv aktiviert waren. Wie erwartet, konnte bei beiden Genotypen auf den über zwei Tage kultivierten, unstimulierten B-Zellen keine Expression von CD86 nachgewiesen werden (Abb. 41 B). Die Stimulation der B-Zellen mit  $\alpha$ -IgM und  $\alpha$ -CD40 führte auf den B-Zellen beider Mausstämme im gleichen Maße zur Expression von CD86 (Abb. 41 B). Dies zeigte, dass sich die aus LMP1/CD30//CD4Cre- und Kontrollmäusen isolierten B-Zellen in vitro in gleicher Weise stimulieren ließen.

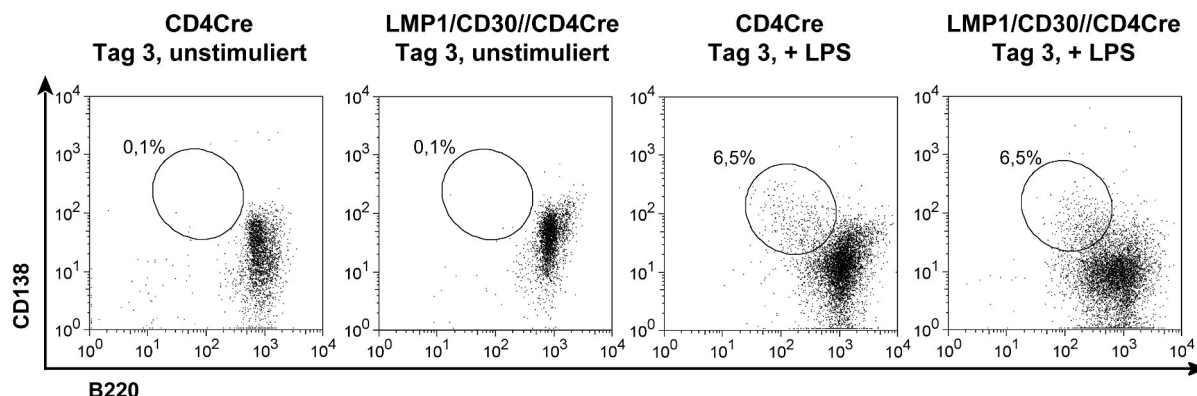




**Abbildung 41: B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zeigen ex vivo und in vitro den gleichen Aktivierungsstatus wie Kontroll-B-Zellen.**

A) Milzzellen von Kontrollmäusen und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen wurden mit  $\alpha$ -B220- und  $\alpha$ -CD86-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die CD86 Expression auf B220<sup>+</sup> B-Zellen. B) Aus Milzen isolierte B-Zellen wurden in Anwesenheit von  $\alpha$ -IgM- und  $\alpha$ -CD40-Antikörpern kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit  $\alpha$ -B220-,  $\alpha$ -CD86-Antikörpern und TOPRO-3 gefärbt und die Expression des Aktivierungsmarkers CD86 durchflusszytometrisch analysiert. Ohne Stimulus kultivierte B-Zellen dienen als Negativkontrolle. Im Histogramm ist die CD86-Expression auf lebenden (TOPRO-3<sup>neg</sup>) B220<sup>+</sup> B-Zellen dargestellt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis. Alle Analysen wurden mit 2-3 Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen durchgeführt.

Um herauszufinden, ob die B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse in vitro fähig sind, nach Zugabe von LPS zu Plasmazellen zu differenzieren, wurden aus der Milz isolierte B-Zellen von Kontroll- und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen für drei Tage in LPS-haltigem Medium kultiviert. B-Zellen, die ohne LPS Zugabe in Kultur genommen wurden, dienten als Negativkontrolle. (Abb. 42, links und mitte links). Die Zugabe von LPS führte nach drei Tagen zur Entstehung von Plasmazellen. Zwischen den beiden Genotypen war kein Unterschied bei den prozentualen Anteilen der entstandenen Plasmazellen zu erkennen (Abb. 42 mitte rechts und rechts).



**Abbildung 42: B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse differenzieren in vitro zu Plasmazellen.**

Aus Milzen von Kontroll- und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen wurden B-Zellen isoliert und über drei Tage kultiviert. Die Zugabe von LPS ins Medium löst die Differenzierung zu Plasmazellen aus. An Tag 3 wurden die Zellen mit  $\alpha$ -B220-,  $\alpha$ -CD138-Antikörpern und TOPRO-3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Dot Plots beziehen sich auf lebende (TOPRO-3<sup>neg</sup>) Zellen. Dargestellt ist der Anteil der Plasmazellen (B220<sup>mittel</sup>, CD138<sup>+</sup>). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis. Die Analysen wurden mit 2-3 Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen durchgeführt.

Diese Experimente zeigten, dass sich die B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse in vitro nach Stimulation hinsichtlich Aktivierungs- und Differenzierungspotential nicht von B-Zellen aus Kontrollmäusen unterschieden. Der Funktionsverlust bezüglich der Bildung von Antikörpern bei den B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen war somit, wie auch die Veränderungen in den B-Zellpopulationen, ein direkter oder indirekter Effekt der LMP1/CD30-exprimierenden T-Zellen.

### **3.5 Der Phänotyp der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse lässt sich bei CD30//CD4Cre-Mäusen durch Immunisierung und Alterung teilweise induzieren**

Die Analyse der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse zeigte, dass konstitutive CD30-Signale in T-Zellen zu einer Blockade in der T<sub>FH</sub>-Zellentwicklung, zu einem aktivierten T-Zellphänotyp und vermutlich zur vermehrten Bildung von Gedächtnis-T-Zellen führten. Nun stellte sich die Frage, ob sich diese Ergebnisse nur auf ein ständig aktives, konstitutives CD30-Signal zurückführen ließen oder ob auch ligandenabhängige CD30-Signale in T-Zellen zu diesen Veränderungen führten.

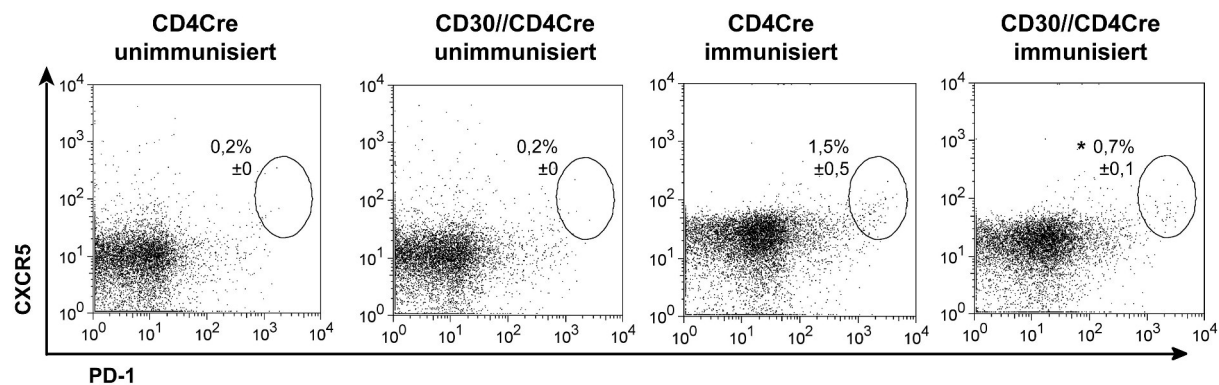
Um den Einfluss von ligandenabhängigen CD30-Signalen auf die Entstehung von T<sub>FH</sub>-Zellen zu analysieren, wurde die T-Zell-abhängige Immunantwort in CD30//CD4Cre-Mäusen untersucht. In gealterten (7-14 Monate) CD30//CD4Cre-Mäusen wurde überprüft, ob ligandenabhängige CD30-Signale, ebenso wie konstitutive CD30 Signale, zur erhöhten Expression von Aktivierungs- und Gedächtnis-T-Zell-Markern auf T-Zellen führen.

#### **3.5.1 Die T-Zell-abhängige Immunisierung führt in CD30//CD4Cre-Mäusen zur verminderten Entstehung von follikulären T-Helferzellen und Keimzentren**

CD30//CD4Cre-Mäuse exprimieren den CD30-Rezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen (Abb. 9), jedoch ist hier für die Auslösung der CD30-Signale die Interaktion des CD30-Rezeptors mit dem CD30-Liganden nötig. Der CD30-Ligand wird auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, aktivierten Makrophagen und Granulozyten exprimiert (Barbieri et al., 2015; Hargreaves und Al-Shamkhani, 2002). Durch Immunisierung der Mäuse kommt es zur Aktivierung der Zellen und somit zu einer verstärkten Expression des CD30-Liganden auf T-Zellen und Makrophagen. Dadurch ist eine Interaktion des CD30-Rezeptors auf der Oberfläche der T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse mit dem CD30-Liganden möglich. Um



herauszufinden, ob die physiologische Interaktion des CD30-Liganden mit dem CD30-Rezeptor einen negativen Einfluss auf die Entstehung der  $T_{FH}$ -Zellen hat, wurden CD30//CD4Cre-Mäuse, die im Gegensatz zu Kontrollmäusen vermehrt CD30 auf der Oberfläche exprimieren, und Kontrollmäuse mit dem T-Zell-abhängigen Antigen NP-CGG immunisiert. Nach zwei Wochen wurden die Milzen der Mäuse entnommen und mit Hilfe des Durchflusszytometers die Bildung von  $T_{FH}$ -Zellen und Keimzentrums-B-Zellen untersucht.



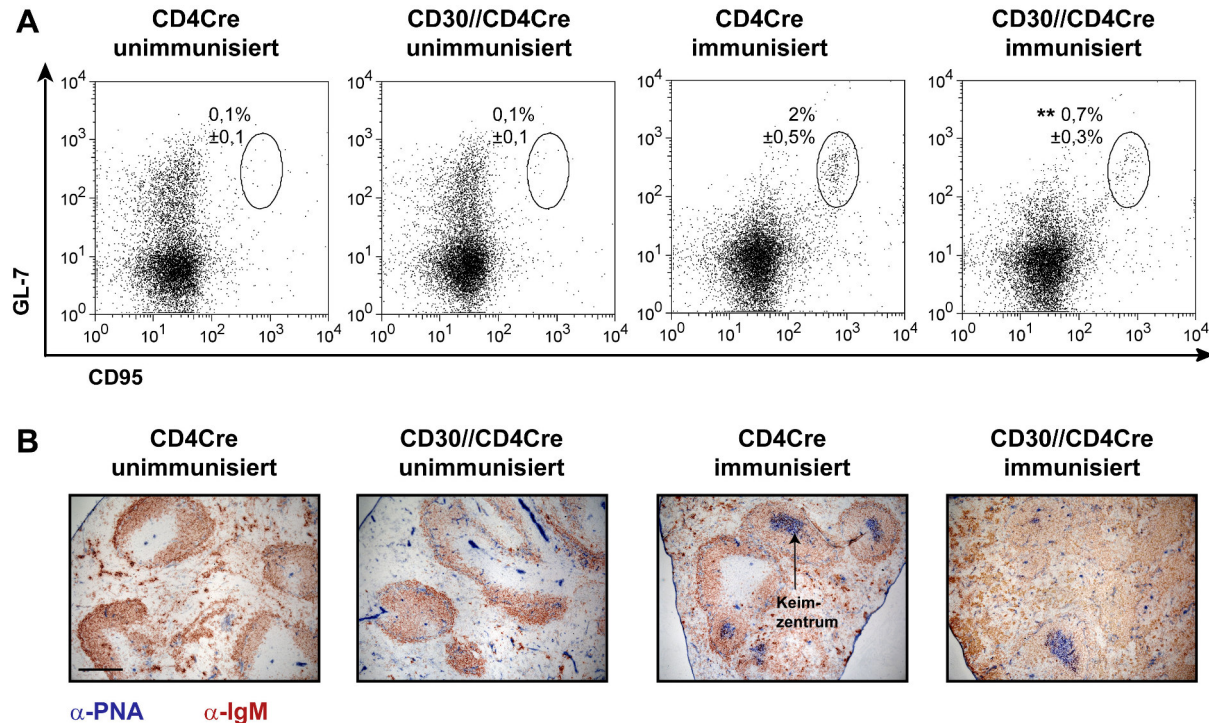
**Abbildung 43: CD30//CD4Cre-Mäuse weisen nach T-Zell-abhängiger Immunisierung geringere prozentuale Anteile von  $T_{FH}$ -Zellen auf.**

Kontrollmäuse und CD30//CD4Cre-Mäuse wurden mit NP-CGG, einem T-Zell-abhängigen Antigen immunisiert. Nach 14 Tagen wurden die Milzzellen mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CXCR5- und  $\alpha$ -PD-1-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch auf die Entstehung der  $T_{FH}$ -Zellen ( $CD4^+$ ,  $CXCR5^+$ ,  $PD-1^+$ ) hin untersucht. Die dargestellten Dot Plots beziehen sich auf  $CD4^+$  T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel mit den prozentualen Mittelwerten aus Analysen von mindestens fünf immunisierten und fünf unimmunisierten Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die Signifikanzberechnung bezieht sich auf die  $T_{FH}$ -Population immunisierter Kontrollmäuse. \* $P < 0,05$ .

Wie erwartet, waren in den Milzen der unimmunisierten Mäuse keine  $T_{FH}$ -Zellen zu finden (Abb. 43, links und mitte links), während diese in den Milzen der immunisierten Mäuse detektiert werden konnten. Hier zeigte sich aber, dass der prozentuale Anteil der  $T_{FH}$ -Zellen in den Milzen der immunisierten CD30//CD4Cre-Mäuse im Vergleich zu immunisierten Kontrollmäusen signifikant vermindert war (Abb. 43, mitte rechts und rechts).

Die Analyse der Keimzentrums-B-Zellen ergab ein ähnliches Bild. Die T-Zell-abhängige Immunisierung führte in den Milzen beider Mausstämmen zur Generierung von Keimzentrums-B-Zellen, jedoch war auch hier der prozentuale Anteil bei den CD30//CD4Cre-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant verringert (Abb. 44 A, mitte rechts und rechts). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden zusätzlich Milzschnitte angefertigt, welche mit dem Keimzentrumsmarker PNA (blau) angefärbt wurden. Die Färbung der Schnitte mit  $\alpha$ -IgM-Antikörper ermöglicht die Detektion von B-Zellen (rot). Die histologische Untersuchung der Milzschnitte bestätigte die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse. Auf Milzschnitten von unimmunisierten Mäusen waren keine Keimzentren nachweisbar (Abb. 44 B, links und mitte links). Bei den Milzschnitten der

immunisierten Kontrollmäusen konnte in fast allen B-Zell-Follikeln Keimzentren detektiert werden, während bei den immunisierten CD30//CD4Cre-Mäusen nur wenige B-Zell-Follikel Keimzentren aufwiesen (Abb. 44 B, mitte rechts und rechts).



**Abbildung 44: Verminderte Bildung von Keimzentren nach T-Zell-abhängiger Immunisierung in den CD30//CD4Cre Mäusen.**

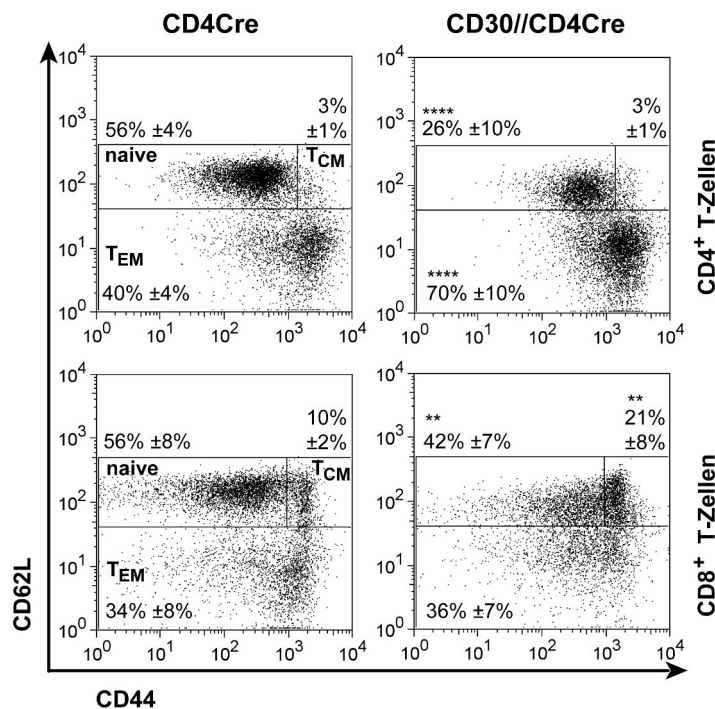
Kontrollmäuse und CD30//CD4Cre-Mäuse wurden mit NP-CGG, einem T-Zell-abhängigen Antigen immunisiert. A) Nach 14 Tagen wurden die Milzzellen mit  $\alpha$ -B220-,  $\alpha$ -CD95- und  $\alpha$ -GL-7-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch auf Keimzentrens-B-Zellen ( $CD95^{\text{hoch}}$ ,  $GL-7^+$ ) hin untersucht. Die dargestellten Dot Plots beziehen sich auf B220<sup>+</sup>-B-Zellen. B) Nach 14 Tagen wurden Gefrierschnitte von Milzen der Mäuse angefertigt. Zum histologischen Nachweis von Keimzentrens-B-Zellen wurden die Schnitte mit  $\alpha$ -IgM-(B-Zellen) und  $\alpha$ -PNA-Antikörpern (Keimzentrens-B-Zellen) gefärbt. Maßstabsbalken = 250  $\mu$ m; 10  $\times$  Vergrößerung. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel und die prozentualen Mittelwerte aus Analysen von mindestens fünf immunisierten und fünf unimmunisierten Mäusen pro Genotyp im Alter von 8-14 Wochen. Die Signifikanzberechnung bezieht sich auf immunisierte Kontrollmäuse. \*\*P < 0,01.

Diese Ergebnisse zeigten, dass nicht nur das konstitutive sondern auch das Liganden-induzierte CD30-Signal einen negativen Einfluss auf die Generierung von  $T_{\text{FH}}$ -Zellen hat und dadurch die Keimzentrensreaktion negativ beeinflusst.

### 3.5.2 Erhöhte Expression von Gedächtnis-T-Zell-Markern in gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen

Um herauszufinden, ob ligandenabhängige CD30-Signale auch zu einer verstärkten Bildung von Gedächtnis-T-Zellen und zur Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen führten, wurden gealterte CD30//CD4Cre- und gealterte Kontrollmäuse untersucht. Da alle Mäuse nicht unter sterilen Bedingungen gehalten wurden, kommt es im Laufe ihrer Lebenszeit

immer öfter zu einer Interaktion mit dem CD30-Liganden und dem aberrant exprimierten CD30-Rezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse. Es wurde untersucht, ob CD30-CD30-Liganden Interaktionen, die im Laufe der Zeit stattfanden, ebenso wie konstitutive CD30-Signale in T-Zellen zur verstärkten Bildung von Gedächtnis-T-Zellen führten. Um dies zu analysieren, wurden Milzzellen mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD8-,  $\alpha$ -CD44- und  $\alpha$ -CD62L-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.



**Abbildung 45: Verteilung von Gedächtnis T-Zellen und naiven T-Zellen in der Milz von älteren Mäusen.**

Milzzellen von 7-14 Monaten alten Kontroll- (links) und CD30//CD4Cre-Mäusen (rechts) wurden mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD8-,  $\alpha$ -CD62L- und  $\alpha$ -CD44-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Verteilung von naiven T-Zellen, (CD62L<sup>hoch</sup>, CD44<sup>niedrig</sup>), zentralen T-Gedächtniszellen (T<sub>CM</sub>) (CD62L<sup>hoch</sup>, CD44<sup>hoch</sup>) und Effektor T-Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) (CD62L<sup>niedrig</sup>, CD44<sup>hoch</sup>) in der Milz. Die prozentuale Verteilung bezieht sich in der oberen Reihe auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen, in der unteren Reihe auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel und die Mittelwerte der prozentualen Anteile von mindestens 10 Mäusen pro Genotyp. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die entsprechende Zellpopulation der Kontrollmäuse. \*\*P < 0,01; \*\*\*\* P < 0,0001.

Das konstitutive CD30-Signal in T-Zellen führte in jungen LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen vermehrt zur Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen und zu einer starken Verminderung des Anteiles an naiven T-Zellen (Abb. 18). Ähnliche Veränderungen wurden bei gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen beobachtet. Während junge CD30//CD4Cre-Mäuse keine Veränderungen hinsichtlich der Verteilung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen im Vergleich zu jungen Kontrollmäusen aufwiesen (Abb. 18, oben), war bei gealterten Tieren dieser Mauslinie der Anteil von CD4<sup>+</sup> T<sub>EM</sub> in der Milz im Vergleich zu gealterten Kontrollmäusen fast doppelt so hoch und der Anteil naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen stark vermindert. Die Anteile von CD4<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> in gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen waren vergleichbar mit denen von gealterten Kontrollmäusen (Abb. 45, oben).

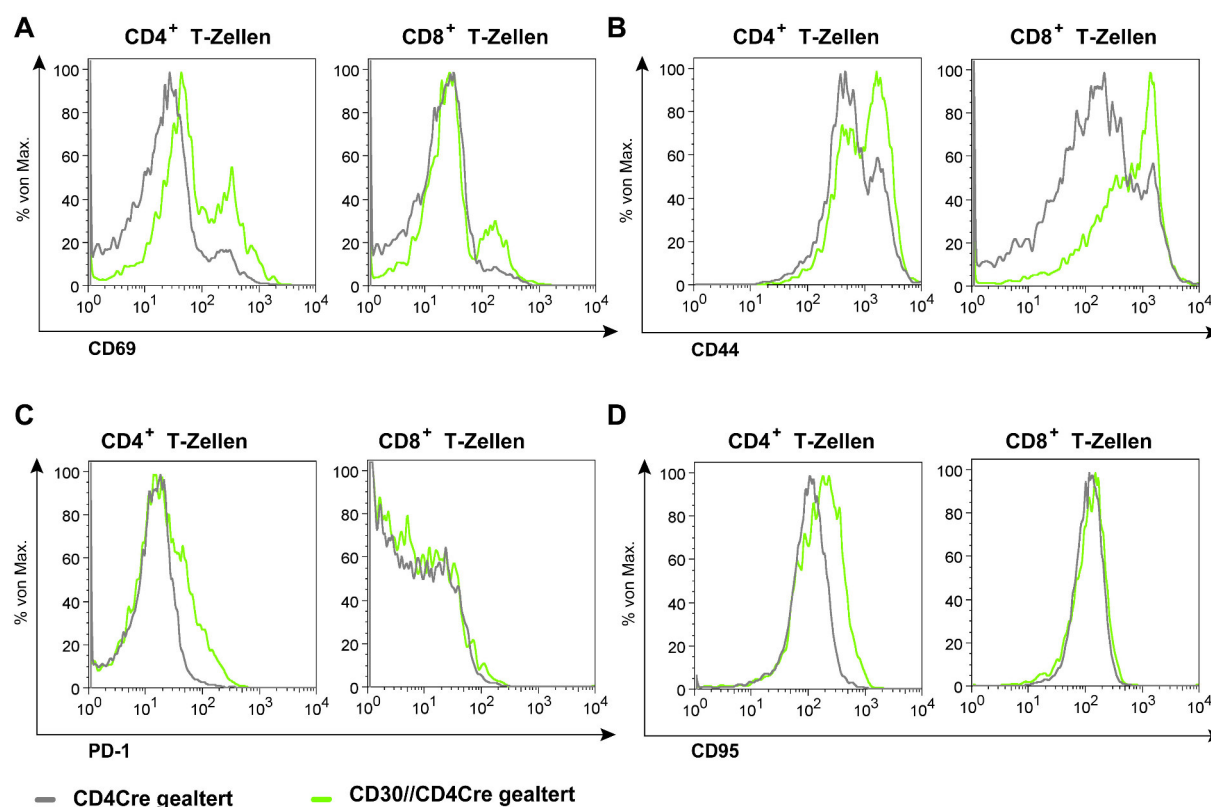
Bei der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation hingegen führte die Expression des CD30-Rezeptors in den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen zu erhöhten Anteilen von zentralen Gedächtnis-T-Zellen in der Milz. Der Anteil war hier, im Vergleich zu gealterten Kontrollmäusen, in etwa doppelt so hoch. Für die CD8<sup>+</sup> T<sub>EM</sub>-Zellpopulation konnten keine Unterschiede im Vergleich zu

gealterten Kontrollmäusen festgestellt werden, der prozentuale Anteil naiver T-Zellen war jedoch fast um die Hälfte reduziert (Abb. 45, unten).

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass ligandenabhängige CD30-Signale, ähnlich wie konstitutive CD30-Signale, einen positiven Einfluss auf die Generierung von Gedächtnis-T-Zellen haben.

### 3.5.3 Die aberrante Expression von CD30 auf T-Zellen gealterter Mäuse führt zur Expression von Aktivierungsmarkern

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob ligandenabhängige CD30-Signale in den T-Zellen gealterter CD30//CD4Cre-Mäuse ebenfalls, wie das konstitutive CD30 Signal, zur Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen führen. Hierfür wurden Milzzellen gealterter Kontroll- und CD30//CD4Cre-Mäuse mit Hilfe des Durchflusszytometers auf die T-Zell-spezifische Expression von CD69, CD44, PD-1 und CD95 hin untersucht.



**Abbildung 46: Erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen gealterter CD30//CD4Cre-Mäuse.**

Milzzellen von gealterten Kontrollmäusen (grau) und gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen (hellgrün) wurden mit  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD8-,  $\alpha$ -CD69-,  $\alpha$ -CD44-,  $\alpha$ -PD-1- und  $\alpha$ -CD95-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist A) die CD69-Expression, B) die CD44-Expression, C) die Expression von PD-1 und D) die Expression von CD95 jeweils auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel. Es wurden mindestens vier Mäuse pro Genotyp untersucht.

Die Milzen der gealterten CD30//CD4Cre Mäuse wiesen, im Vergleich zu Kontrollmäusen, erhöhte Anteile von CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, sowie CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf (Abb. 46 A). Betrachtet man die CD44 Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei gealterten Kontrollmäusen, so waren zwei Populationen, eine CD44<sup>niedrig</sup> (naiven T-Zellen) und eine CD44<sup>hoch</sup> (aktivierte oder Gedächtnis-T-Zellen) zu erkennen. Dies war auch für die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Milzen gealterter CD30//CD4Cre-Mäuse der Fall, jedoch war hier die CD44<sup>hoch</sup>-Population vermehrt vorhanden (Abb. 46 B). Dies war nicht verwunderlich, da bereits bekannt war, dass in Milzen gealterter CD30//CD4Cre-Mäuse vermutlich vermehrt Gedächtniszellen vorhanden sind (Abb. 45). Die Expression der Aktivierungsmarker PD-1 und CD95 war auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der gealterten CD30//CD4Cre-Mäuse ebenfalls erhöht, während sich die Expressionslevel der beiden Marker auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen dieser Mäuse im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Kontrollmäusen auf den gleichen Niveau befanden (Abb. 46 C und D).

Dies zeigt, dass das ligandenabhängige CD30-Signal in T-Zellen gealterter CD30//CD4Cre-Mäuse hauptsächlich die Expression der Aktivierungsmarker auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert.

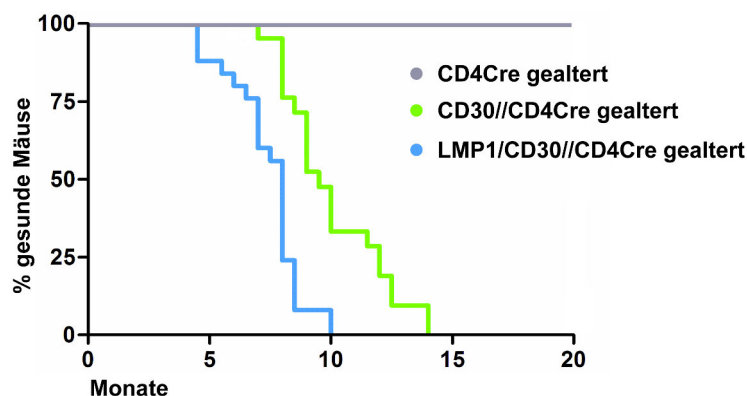
### **3.6 Führen deregulierte CD30-Signale in T-Zellen zur Tumorentstehung in gealterten Mäusen?**

Tumorzellen des anaplastischen großzelligen Lymphoms (ALCL) exprimieren in hohem Maße den CD30-Rezeptor (Schirrmann et al., 2014; Stein et al., 2000). Da sich diese Tumorzellen aus T-Zellen entwickeln, stellte sich uns die Frage, ob die Expression des LMP1/CD30-Fusionsproteins, sowie die aberrante CD30-Expression in T-Zellen, zur Tumorentstehung führen. Um diese Frage zu beantworten, wurden LMP1/CD30//CD4Cre-, CD30//CD4Cre-, sowie Kontrollmäuse über einen längeren Zeitraum gehalten und durch regelmäßiges Abtasten auf eine Tumorentstehung hin untersucht.

#### **3.6.1 Gealterte LMP1/CD30//CD4Cre- und CD30//CD4Cre Mäuse zeigen starke pathologische Auffälligkeiten**

Im Langzeitversuch wurden die Mäuse erst dann analysiert, wenn diese starke, pathologische Veränderungen zeigten, so dass die weitere Haltung der Mäuse nicht mit dem Tierschutzgesetz vereinbar war. In CD30//CD4Cre-Mäusen wurde im Alter von 7-14 Monaten eine starke Vergrößerung der Milz ertastet, die die Analyse der Mäuse nötig machte. Die LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse erkrankten bereits im Alter von 4,5-10 Monaten (Abb. 47).

Die Symptome, die zum Abbruch des Langzeitexperimentes und zur sofortigen Analyse der Mäuse führten, waren hier jedoch sehr unspezifisch. Die Tiere waren oft abgemagert und wirkten apathisch. Bei Kontrollmäusen konnte, bis zum Abbruch des Langzeitversuchs nach 20 Monaten, keine Erkrankung der Mäuse festgestellt werden (Abb. 47).



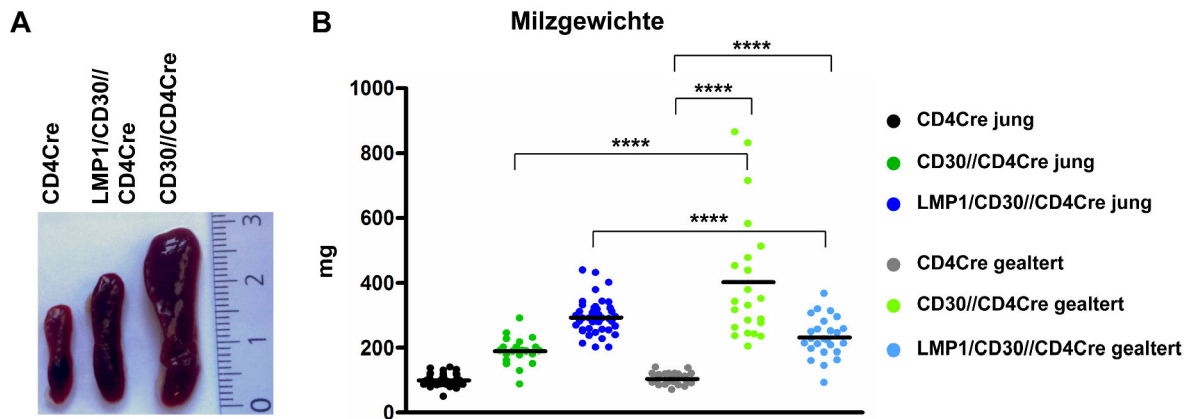
**Abbildung 47: LMP1/CD30//CD4Cre- und CD30//CD4Cre-Mäuse erkranken nach einigen Monaten.**

LMP1/CD30//CD4Cre- (hellblau), CD30//CD4Cre- (hellgrün) und Kontrollmäuse (grau) wurden über einen längeren Zeitraum gehalten und regelmäßig auf pathologische Auffälligkeiten hin untersucht. Dargestellt ist der Prozentsatz von gesunden Mäusen (y-Achse) nach einigen Monaten (x-Achse).

### 3.6.2 Die Expression von LMP1/CD30 und CD30 in T-Zellen führt in gealterten Mäusen zur Splenomegalie und erhöhten Zellzahlen in der Milz

Von den erkrankten, gealterten transgenen Mäusen, sowie von Kontrollmäusen gleichen Alters, wurden zunächst die Milzgrößen bestimmt. Bei den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen war eine ausgeprägte Splenomegalie erkennbar. Die gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse wiesen im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollmäusen nur eine leichte Vergrößerung der Milz auf (Abb. 48 A). Die Milzen der gealterten CD30//CD4Cre-Mäuse waren im Schnitt viermal, die Milzen der gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse im Durchschnitt doppelt so schwer wie Milzen von Kontrollmäusen gleichen Alters (Abb. 48 B). Der Vergleich der Milzgewichte von gealterten und jungen Mäusen lieferte zusätzliche, interessante Ergebnisse. Die Milzgewichte der gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse waren geringer als die Milzgewichte von jungen Mäusen des gleichen Genotyps. Bei den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen waren die Milzen jedoch deutlich schwerer als Milzen von jungen CD30//CD4Cre-Mäusen. Bei Kontrollmäusen gab es keine Unterschiede zwischen jungen und gealterten Mäusen (Abb. 48, B).

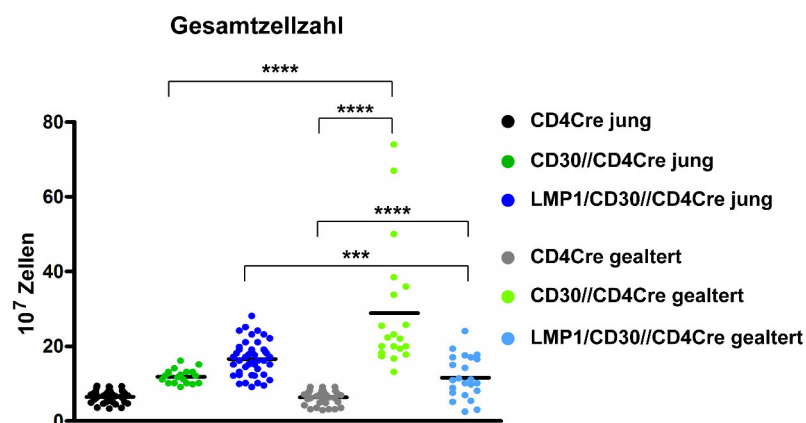




**Abbildung 48: Vergleich der Milzgrößen und Milzgewichte in gealterten Mäusen.**

A) Größenvergleich der Milzen von gealterten CD30//CD4Cre- (rechts), LMP1/CD30//CD4Cre- (mitte), und Kontrollmäusen (links). B) Darstellung und Vergleich der Milzgewichte von gealterten und jungen Mäusen. Junge Kontrollmäuse (schwarz), junge CD30//CD4Cre-Mäuse (grün), junge LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse (blau), gealterte Kontrollmäuse (grau), gealterte CD30//CD4Cre-Mäuse (hellgrün), gealterte LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse (hellblau). \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ;  $n = 20-30$ . Der schwarze Balken kennzeichnet die Mittelwerte.

Die Bestimmung der Gesamtzellzahlen der Milzen von gealterten Mäusen spiegeln die Daten der Milzgewichte wieder. Auch hier zeigte sich bei den CD30//CD4Cre-Mäusen eine vierfache, bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen eine zweifache Erhöhung der Milzzellzahlen im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abb. 49). Der Vergleich der Gesamtzellzahlen der Milz von gealterten und jungen Mäusen gab ebenfalls die Beobachtungen des Vergleichs der Milzgewichte wieder. Die Gesamtzellzahlen der Milzen von gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen waren im Vergleich zu jungen Mäusen dieses Stammes deutlich erhöht, während die Gesamtzellzahlen der Milzen von gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen des gleichen Genotyps reduziert waren. Bei den Kontrollmäusen waren keine Unterschiede hinsichtlich der Gesamtzellzahlen der Milzen zwischen gealterten und jungen Mäusen erkennbar (Abb. 49).

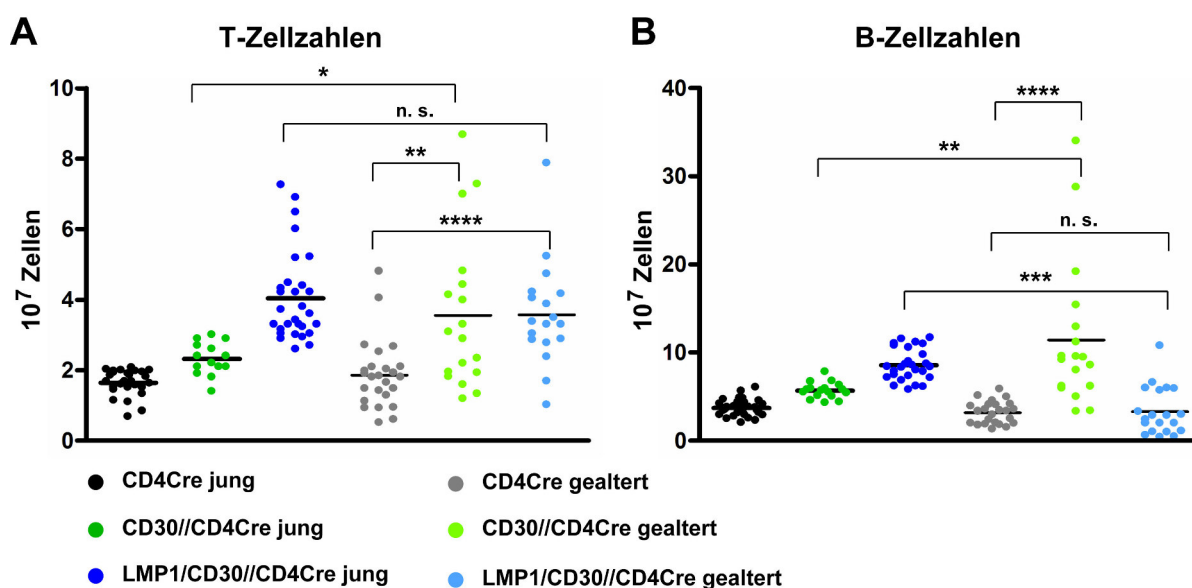


**Abbildung 49: Vergleich der Gesamtzellzahlen der Milzen von gealterten und jungen Mäusen.**

Die Gesamtzellzahlen der Milzen von gealterten Mäusen wurden mit den Gesamtzellzahlen von Milzen junger Mäuse verglichen. Junge Kontrollmäuse (schwarz), junge CD30//CD4Cre-Mäuse (grün), junge LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse (blau), gealterte Kontrollmäuse (grau), gealterte CD30//CD4Cre Mäuse (hellgrün), gealterte LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse (hellblau). \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ;  $n = 20-30$ . Der schwarze Balken kennzeichnet die Mittelwerte.

### 3.6.3 In LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen sind in der Milz die T-Zellen expandiert und die B-Zellen reduziert

Die Splenomegalie war bei den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen noch stärker ausgeprägt als bei jungen Mäusen dieses Mausstammes. Bei den gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen war das durchschnittliche Milzgewicht jedoch signifikant geringer als bei jungen LMP1/CD30//CD4Cre Mäusen (Abb. 48). Um herauszufinden, ob sich diese Veränderungen auf eine Expansion, bzw. Depletion der T-Zellen zurückführen ließen, wurden die absoluten T- und B-Zellzahlen in den Milzen der gealterten Mäuse bestimmt. Hierzu wurden Milzzellen mit B- und T-Zell-spezifischen Antikörpern gefärbt und mit Hilfe des Durchflusszytometers die prozentualen Anteile dieser Zellen ermittelt. Anhand dieser Daten wurden die absoluten B- und T-Zellzahlen in den Milzen gealterter Mäuse berechnet und mit den absoluten B- und T-Zellzahlen junger Mäuse verglichen.



**Abbildung 50: Vergleich der B- und T-Zellzahlen in Milzen von gealterten und jungen Mäusen.**

Milzzellen von gealterten Mäusen wurden mit  $\alpha$ -B220- und  $\alpha$ -CD3-Antikörpern gefärbt. Nach durchflusszytometrischer Analyse konnten die prozentualen Anteile der T- ( $CD3^+$ ) und B-Zellen ( $B220^+$ ) bestimmt, und die absoluten B- und T-Zellzahlen berechnet werden. Dargestellt sind in A) die absoluten T-Zellzahlen und in B) die absoluten B-Zellzahlen junger und gealterter Mäuse. Junge Kontrollmäuse (schwarz), junge CD30//CD4Cre Mäuse (grün), junge LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse (blau), gealterte Kontrollmäuse (grau), gealterte CD30//CD4Cre Mäuse (hellgrün), gealterte LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse (hellblau). n.s. = nicht signifikant; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ ;  $n = 20-30$ . Der schwarze Balken kennzeichnet die Mittelwerte.

Die T-Zellzahlen von beiden gealterten transgenen Mausstämmen waren im Vergleich zu gealterten Kontrollmäusen erhöht. Die Expansion der T-Zellen in der Milz von jungen CD30//CD4Cre-Mäusen nahm in gealterten Mäusen dieses Genotyps noch weiter zu, während bei gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen dieser

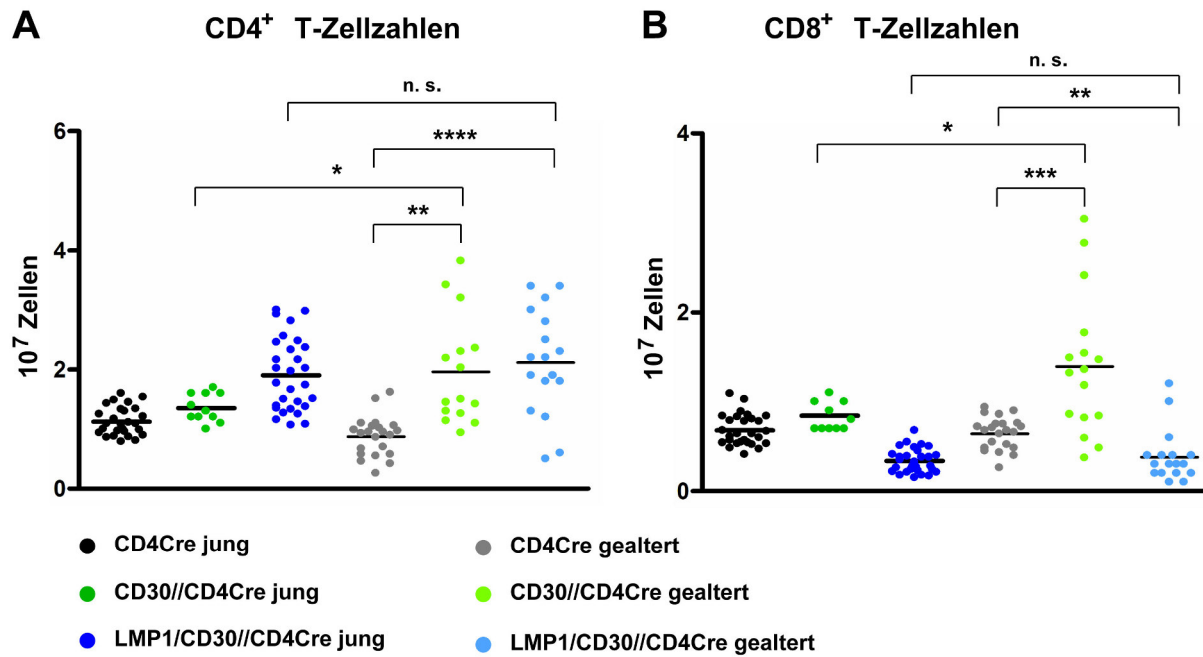


Mauslinie kein signifikanter Anstieg der absoluten T-Zellzahlen in der Milz zu erkennen war (Abb. 50 A). Anders verhielt es sich bei den B-Zellzahlen in der Milz. Bei den älteren CD30//CD4Cre-Mäusen waren diese, im Vergleich zu jungen CD30//CD4Cre-Mäusen und älteren Kontrollmäusen, erhöht. Bei den gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen waren die B-Zellzahlen jedoch im Vergleich zu jungen Mäusen dieses Genotyps signifikant erniedrigt (Abb. 50 B).

Es ist anzunehmen, dass die weitere Expansion von T- und B-Zellen in den Milzen zu der starken Splenomegalie der gealterten CD30//CD4Cre-Mäuse beitrug. Die Abnahme des durchschnittlichen Milzgewichtes der gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse war vermutlich auf die Depletion der B-Zellen zurückzuführen, da die Durchschnittswerte der absoluten T-Zellzahlen mit denen von jungen Mäusen vergleichbar waren.

#### **3.6.4 In den Milzen der gealterten CD30//CD30Cre-Mäuse sind $CD4^+$ , sowie $CD8^+$ T-Zellen expandiert**

Um herauszufinden, ob die weitere T-Zellexpansion in den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen durch  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Zellen ausgelöst wurde und ob die Depletion der  $CD8^+$  T-Zellen in gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen zunahm, wurden im nächsten Schritt die absoluten Zellzahlen von  $CD4^+$ , sowie  $CD8^+$  T-Zellen bestimmt. Hierzu wurden Milzzellen der gealterten Mäuse mit  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD4- und  $\alpha$ -CD8-Antikörpern gefärbt, durchflusszytometrisch analysiert und anhand dieser Daten die absoluten Zellzahlen berechnet. Um mögliche Veränderungen durch das Altern der Mäuse feststellen zu können, wurden die errechneten Zellzahlen mit den absoluten Zellzahlen für  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen von jungen Mäusen verglichen.



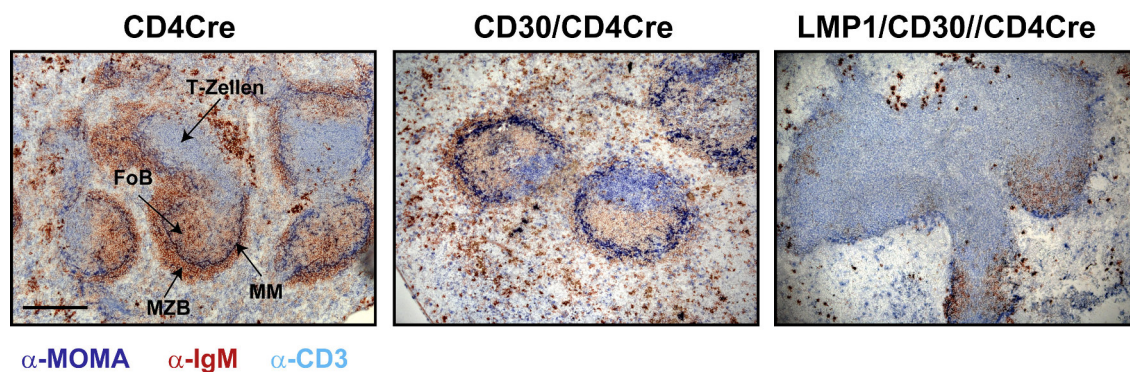
**Abbildung 51: Vergleich der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen in Milzen von jungen und gealterten Mäusen.**

Milzzellen von LMP1/CD30//CD4Cre-, CD30//CD4Cre- und Kontrollmäusen wurden mit  $\alpha$ -CD3-,  $\alpha$ -CD4- und  $\alpha$ -CD8-Antikörpern gefärbt. Nach durchflusszytometrischer Analyse konnten die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt und die absoluten Zellzahlen berechnet werden. Dargestellt sind in A) die absoluten CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen und in B) die absoluten CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen junger und gealterter Mäuse. Junge Kontrollmäuse (schwarz), junge CD30//CD4Cre-Mäuse (grün), junge LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse (blau), gealterte Kontrollmäuse (grau), gealterte CD30//CD4Cre-Mäuse (hellgrün), gealterte LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse (hellblau). n.s. = nicht signifikant; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ ;  $n = 20-30$ . Der schwarze Balken kennzeichnet die Mittelwerte.

Bei den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen war die Anzahl von CD4<sup>+</sup>, sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu gealterten Kontrollmäusen erhöht. Auch im Vergleich zu jungen CD30//CD4Cre Mäusen lagen erhöhte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen vor (Abb. 51 A und B). Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen entsprach dem der jungen CD30//CD4Cre Mäuse (nicht gezeigte Daten). Diese Ergebnisse zeigten, dass die weitere Expansion der T-Zellen in den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen nicht spezifisch durch eine T-Zellpopulation ausgelöst wird, die Expansion betraf sowohl die CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Auch bei den Milzen der gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse konnten keine Veränderungen hinsichtlich des Verhältnisses von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden (nicht gezeigte Daten), da die Anzahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu jungen Mäusen dieser Genotyps aufwiesen (Abb. 51 A und B). Die Alterung der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse führte somit weder zu einer weiteren Depletion der CD8<sup>+</sup>, noch zu einer weiteren Expansion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

### 3.6.5 Die Struktur der Milzen gealterter, transgener Mäuse zeigt keine Anzeichen einer Tumorentstehung

Trotz der ansteigenden T-Zellzahlen in den Milzen gealterter CD30//CD4Cre-Mäusen war noch nicht abschließend geklärt, ob die Expansion durch einen T-Zelltumor ausgelöst wurde. Auch bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen war nicht klar, ob die erhöhten CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen in der Milz Folge eines T-Zell-Lymphoms waren. Um diese Fragen zu beantworten, wurden von Milzen gealterter CD30//CD4Cre-, LMP1/CD30//CD4Cre- und Kontrollmäusen Milzschnitte angefertigt und zur Begutachtung der Pathologin L. Quintanilla-Fendt (Universitätsklinikum Tübingen, Mauspathologie) geschickt. Vorab wurden die Präparate mit  $\alpha$ -IgM-,  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -MOMA-Antikörpern gefärbt, um B-Zellen, T-Zellen und metallophile Makrophagen sichtbar zu machen.



**Abbildung 52: Follikelstrukturen von Milzen gealterter Mäuse.**

Gefrierschnitte von Milzen gealterter Kontrollmäuse (links), CD30//CD4Cre- (mitte), und LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse (rechts) wurden mit  $\alpha$ -IgM- (B-Zellen; rot),  $\alpha$ -CD3- (T-Zellen; hellblau) und  $\alpha$ -MOMA-Antikörpern (metallophile Makrophagen im Marginalsinus; dunkelblau) gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus Analysen von mindestens 5 Mäusen pro Genotyp. MZB = Marginalzonen B-Zellen, FoB = follikuläre B-Zellen, MM = metallophile Makrophagen. Maßstabsbalken = 250  $\mu$ m; 10  $\times$  Vergrößerung.

Bei den Milzen der gealterten CD30//CD4Cre-Mäuse wurde eine verminderte Größe der weißen Pulpa festgestellt, die allgemeine Struktur des Follikels war jedoch nicht verändert. Die Marginalzone mit den Marginalzonen-B-Zellen war im Vergleich zu gealterten Kontrollmäusen weniger stark ausgeprägt. Die erhöhten T- und B-Zellzahlen waren somit nur mit der stark ausgeprägten Splenomegalie dieser Mäuse zu erklären. Die Milzen der gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse wiesen eine Expansion des T-Zellkompartiments auf, wohingegen das B-Zellkompartiment stark dezimiert war. Die T-Zellen waren jedoch noch im Follikel lokalisiert, sodass eine Lymphom-Entstehung unwahrscheinlich war. Wie auch schon bei jungen LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen waren Marginalzonen-B-Zellen kaum erkennbar (Abb. 52). Die Pathologin L. Quintanilla-Fendt konnte bei beiden gealterten transgenen Mausstämmen keine Anzeichen einer Lymphom-Entwicklung erkennen.

## 4 Diskussion

Über die physiologische Funktion von CD30-Signalen in T-Zellen war zu Beginn dieser Arbeit nur wenig bekannt. Einige Untersuchungen deuteten auf einen möglichen Einfluss von CD30-Signalen bei der Entstehung von CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen hin (Gaspal et al., 2005). Außerdem gab es widersprüchliche Daten zum Einfluss von CD30-Signalen auf die Differenzierung zu T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen. Einige Gruppen publizierten, dass CD30-Signale die Differenzierung zu T<sub>H</sub>2-Zellen fördern, andere Daten zeigten, dass CD30 Signale eine Rolle bei der T<sub>H</sub>1 Immunantwort spielen (Del Prete et al., 1995; Gaspal et al., 2008; Tang et al., 2008). Eine hohe Expression des CD30-Rezeptors kennzeichnet die Tumorzellen des anaplastischen großzelligen Lymphoms, einem T-Zell-Lymphom (Schirrmann et al., 2014; Stein et al., 2000). Es ist aber nicht bekannt, ob CD30-Signale zur Pathogenese dieses Tumors beitragen, oder ob CD30 erst auf den bereits entstandenen Tumorzellen exprimiert wird. Grund für die schlechte Daten-Lage hinsichtlich der physiologischen und pathophysiologischen Funktion von CD30 sind: (i) es existieren keine guten Mausmodelle. So kann bei den vorhandenen konventionellen CD30-knock-out und CD30-L-knock-out Mäusen nicht sicher bestimmt werden, von welchem Zelltyp der Phänotyp ausgeht: (ii) viele Untersuchungen wurden an Tumorzell-Linien durchgeführt. Es ist jedoch problematisch diese Ergebnisse direkt auf primäre T-Zellen zu übertragen. (iii) In Wildtyp Mäusen wird CD30 nur auf sehr wenigen aktivierten Zellen exprimiert, daher ist es schwierig die Funktion von CD30-Signalen in Wildtyp Mäusen zu untersuchen.

Um herauszufinden, ob die Expression des CD30-Rezeptors in T-Zellen zur Tumorentstehung führt und welche physiologische Rolle CD30-Signale in T-Zellen spielen, wurden in unserem Labor zwei transgene Mausstämme generiert, die die Transgene LMP1/CD30 bzw. CD30 abhängig von der Cre-Rekombinase exprimieren. Durch Kreuzung dieser Mäuse mit CD4Cre-Mäusen kommt es zur T-Zell-spezifischen Expression von LMP1/CD30 bzw. CD30. In LMP1/CD30-exprimierenden T-Zellen ist das CD30-Signal konstitutiv aktiv, während bei CD30-exprimierenden T-Zellen die CD30-Signale ligandenabhängig sind. Da in diesen beiden Mausmodellen die Expression von LMP1/CD30 bzw. CD30 auf fast allen T-Zellen stattfindet, konnte anhand dieser beiden Mauslinien die Rolle von CD30-Signalen spezifisch in T-Zellen untersucht werden.

## 4.1 Die Expression und Regulation des CD30-Rezeptors auf T-Zellen

Zu Beginn der Arbeit wurde die Expression von LMP1/CD30 bzw. CD30 in den beiden transgenen Mausstämmen untersucht. Da hinter die beiden Transgene eine interne Ribosomenbindestelle und das Reportergen hCD2 kloniert wurde, wurden die Expression und die Expressionsstärke der beiden Transgene zuerst über die Expression von hCD2 beurteilt. Nahezu alle T-Zellen in der Peripherie exprimierten hCD2, was darauf hinweist, dass die STOP-Kassette durch CD4-Cre sehr effizient deletiert wurde. Die Expressionstärke von hCD2 war auf den T-Zellen der CD30/CD4Cre-Mäuse höher als auf den T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse. Dies kommt dadurch zustande, dass die Expression von hCD2 und CD30 bei den CD30/CD4Cre-Mäusen unter der Kontrolle des starken CAGGs-Promotors steht, während bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen die Expression des Reporters hCD2, sowie des Fusionsproteins LMP1/CD30, über den schwachen, endogenen *rosa26*-Promotor vermittelt wird. Obwohl bei den CD30/CD4Cre-Mäusen hCD2 und CD30 unter Kontrolle des gleichen Promotors stehen, erschien die CD30-Expression im Vergleich zu hCD2 sehr schwach. Es ist jedoch möglich, dass die detektierte niedere Expression von CD30 von einer geringen Avidität des verwendeten  $\alpha$ -CD30-Antikörpers herrührt.

Um die Expressionsstärke von CD30 auf den transgenen T-Zellen besser beurteilen zu können, haben wir untersucht, ob CD30 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD30/CD4Cre-Mäuse in höherem Maße als auf aktivierten CD4<sup>+</sup>-T Zellen von Kontrollmäusen exprimiert wird. Die CD30-Expression auf Wildtyp-T-Zellen kann durch die Stimulation mit  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-Antikörpern in vitro induziert werden (Barbieri et al., 2015; Ellis et al., 1993; Toennies et al., 2004). Wir konnten zeigen, dass unstimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse eine höhere Expression des CD30-Rezeptors zeigten, als die aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse. Durch Stimulation konnte nur eine minimale Steigerung der CD30-Expression auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse erreicht werden. Dies deutet darauf hin, dass auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen dieser Mäuse wahrscheinlich die maximale mögliche Expression des CD30-Rezeptors auf der Oberfläche erreicht ist.

Die Expression von CD30 auf der Oberfläche der Zellen wird durch Abspaltung des extrazellulären Anteils des CD30-Rezeptors durch die Proteasen ADAM10 und ADAM17 (*A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*) reguliert, der Rezeptor liegt dann als „lösliches“ CD30 im Blut vor (Eichenauer et al., 2007; Vahdat et al., 2010; Velasquez et al., 2013). Erhöhte Mengen von löslichem CD30 im Blut werden bei einigen Autoimmunerkrankungen, chronischen Virusinfektionen, oder einigen Tumoren, die mit einer

erhöhten Zahl von CD30-exprimierenden Zellen einhergehen, nachgewiesen. (Amedei et al., 2013; Barbieri et al., 2015; Kennedy et al., 2006). Auch im Blut der CD30//CD4Cre-Mäuse konnte lösliches CD30 detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die Expressionslevel des CD30-Rezeptors auf den T-Zellen dieser Mäuse auch durch Abspaltung reguliert wird.

Tumorzellen des anaplastischen großzelligen Lymphoms zeigen im Vergleich zu aktivierten T-Zellen eine starke Überexpression des CD30-Rezeptors (Ho et al., 2009). Obwohl die CD30-Expression auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der CD30/CD4Cre-Mäuse etwas höher als auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse war, denken wir, dass die T-Zellen der CD30/CD4Cre-Mäuse nicht ähnlich hohe CD30-Expressionslevel erreichen wie die Tumorzellen des anaplastischen großzelligen Lymphoms. Wahrscheinlich werden extrem hohe CD30 Level, wie sie auf Tumorzellen zu beobachten sind, nur erreicht, wenn die Abspaltung von CD30 gestört ist. TIMP-Proteine (*tissue inhibitor of metalloproteinases*), welche von vielen Zelltypen sekretiert werden, regulieren die Funktion der ADAM-Proteasen. So wird die Aktivität von ADAM10 durch TIMP-1 und TIMP-3 inhibiert (Amour et al., 2000; Duan et al., 2015; Rapti et al., 2008). Es wurde beschrieben, dass die TIMP-1 Expression in Subtypen des anaplastischen großzelligen Lymphoms erhöht ist. In einigen CD30<sup>+</sup> Hodgkin-Lymphom-Zelllinien konnte sogar eine konstitutive Expression von TIMP-1 nachgewiesen werden (Lai et al., 2004; Oelmann et al., 2002). Dies könnte darauf hinweisen, dass durch die verstärkte Inhibition der ADAM10 Aktivität die Abspaltung der extrazellulären CD30-Domäne eingeschränkt ist, und dadurch die sehr hohe Expression des CD30-Rezeptors auf der Oberfläche von Tumorzellen erreicht werden kann.

Erstaunlicherweise konnte kein CD30 auf der Oberfläche der T-Zellen von LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen nachgewiesen werden, obwohl diese einen aktivierten Phänotyp aufwiesen. Ebenfalls war es nicht möglich, die Expression des endogenen CD30-Rezeptors durch Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren. Außerdem konnte im Blut dieser Mäuse kein lösliches CD30 detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Expression des endogenen CD30-Rezeptors durch die konstitutiven CD30-Signale verhindert wird. Es war bereits bekannt, dass die anhaltende Stimulation des CD30-Rezeptors mit einem Membran-gebundenen CD30 Antikörper, oder auch mit einigen löslichen CD30-Antikörpern, zur Verringerung der CD30-Expression auf der Zelloberfläche führt. Dies führte zu anfänglichen Problemen bei der CD30-Antikörper basierten Tumorthherapie (Hansen et al., 2000; Matthey et al., 2004; Schnell et al., 2002). Es wurde vermutet, dass die Verringerung der CD30-Expression auf der Zelloberfläche durch eine verstärkte Abspaltung des CD30-Rezeptors verursacht wird. Unsere Daten zeigten, dass in LMP1/CD30//CD4Cre-

Mäusen kein lösliches CD30 im Serum nachweisbar war, dies könnte darauf hinweisen, dass die Expression des CD30-Rezeptors bei sehr starker oder konstitutiven Stimulierung auf der Zelloberfläche nicht nur durch Abspaltung der extrazellulären CD30 Domäne, sondern auch durch Inhibierung der Neusynthese reguliert wird. Ob diese Regulation auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene erfolgt, ist uns im Moment noch nicht bekannt und sollte noch untersucht werden.

## **4.2 CD30-Signale in T-Zellen führen zur Splenomegalie und erhöhten Zellzahlen in der Milz**

Bei beiden transgenen Mausstämmen konnte eine Splenomegalie festgestellt werden. Die B- und T-Zellzahlen waren in den Milzen beider Mäuse erhöht, wobei dieser Effekt bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen im Vergleich zu den CD30//CD4Cre-Mäusen stärker ausgeprägt war. Die erhöhten B-Zellzahlen sind ein sekundärer Effekt der T-Zellexpansion, da das Transgen, wie in der Arbeit gezeigt, nur in den T-Zellen exprimiert wird. Die T-Zell-Expansion war in jungen LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen im Vergleich zu jungen CD30//CD4Cre-Mäusen stärker ausgeprägt. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass in den T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse das CD30-Signal konstitutiv aktiv ist, während der CD30-Rezeptor auf den T-Zellen der CD30//CD4Cre-Mäuse zur Aktivierung der CD30-Signale mit dem CD30-Liganden, welcher auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten exprimiert wird (Barbieri et al., 2015; Hargreaves und Al-Shamkhani, 2002), interagieren muss. Wahrscheinlich kommt es nicht bei allen CD30-exprimierenden T-Zellen zur Interaktion mit dem CD30-Liganden, sodass die durch CD30-Signale verstärkte Proliferation nicht alle CD30-exprimierenden T-Zellen betraf.

Da in den älteren CD30/CD4Cre-Mäusen mehr Makrophagen und Granulozyten vorhanden waren, könnte dies dazu führen, dass die CD30-exprimierenden T-Zellen öfter als in jungen CD30/CD4Cre-Mäusen auf CD30-L-exprimierende Zellen trafen. Dies könnte der Grund sein, dass in den gealterten CD30/CD4Cre-Mäusen die T-Zellen, im Vergleich zu jungen Mäusen dieses Genotyps, stärker expandiert und aktiviert waren. Gealterte LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse wiesen im Vergleich zu jungen LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen keine signifikante Erhöhung der T-Zellzahlen in der Milz auf. Da die T-Zellen dieser Mauslinie durch die Expression von LMP1/CD30 ligandenunabhängig konstitutive CD30-Signale erhalten, spielt eine mögliche Anreicherung von CD30-Liganden-exprimierenden Zellen im Laufe der Zeit für die Aktivierung der CD30-Signale keine Rolle. Zudem konnten

wir bereits zeigen, dass es auf LMP1/CD30-exprimierenden T-Zellen nicht zur Expression des endogenen CD30-Rezeptors kommt, sodass zusätzliche, über den endogenen CD30-Rezeptor vermittelte, ligandenabhängige CD30-Signale nicht möglich sind. Sowohl in jungen als auch in gealterten CD30//CD4Cre Mäusen waren die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Kontrollmäusen in gleichen Maße expandiert. In den Milzen und in den Lymphknoten junger LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse hingegen konnten, im Vergleich zu Kontrollmäusen, nur für CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhöhte Zellzahlen festgestellt werden, während die CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen reduziert waren. Wie wir zeigen konnten, war die verringerte Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen der LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse nicht auf einen Defekt in der T-Zellentwicklung im Thymus zurückzuführen, sondern auf einen Erschöpfungszustand der T-Zellen (wird in Kapitel 4.5 diskutiert).

### 4.3 Fördern CD30-Signale die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen?

Gaspal und Kollegen konnten zeigen, dass nach Immunisierung von CD30-knock-out Mäusen weniger Gedächtnis-CD4<sup>+</sup> T-Zellen gebildet werden (Gaspal et al., 2005). Dies könnte darauf hinweisen, dass CD30-Signale die Entstehung von Gedächtnis-T-Zellen positiv beeinflussen. Um diese Frage zu klären, wurden die Anteile von Effektor-T-Gedächtniszellen (T<sub>EM</sub>) und zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>CM</sub>) in den Milzen der transgenen Mäuse und von Kontrollmäusen bestimmt. Murine T<sub>EM</sub> sind als CD62L<sup>niedrig</sup>CD44<sup>hoch</sup> charakterisiert, während T<sub>CM</sub> als CD62L<sup>hoch</sup>CD44<sup>hoch</sup> definiert werden (Gupta und Garg, 2015; Hu und August, 2008; Krishnan et al., 2007).

Obwohl in der Literatur oft T<sub>EM</sub> und T<sub>CM</sub> durch die verschiedene Expressionsstärke dieser beiden Marker definiert werden, ist es bei gleichzeitigen Vorhandensein von vielen aktivierten T-Zellen nicht möglich, zwischen T<sub>EM</sub> und aktivierten T-Zellen zu unterscheiden, da auch aktivierte T-Zellen erhöhte Expressionslevel von CD44 und eine geringe Expression von CD62L aufweisen (Baaten et al., 2012; Gasper et al., 2014; Jiang et al., 2015).

Bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen war bereits in jungen Mäusen eine Abnahme der prozentualen Anteile naiver CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu beobachten. Gleichzeitig waren die Anteile von CD62L<sup>hoch</sup>CD44<sup>hoch</sup> T<sub>CM</sub> und von CD62L<sup>niedrig</sup>CD44<sup>hoch</sup> Zellen unter den CD4<sup>+</sup> wie auch unter den CD8<sup>+</sup> T-Zellen erhöht. Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass CD30-Signale die Differenzierung zu Gedächtnis-T-Zellen treiben. Jedoch konnte nicht endgültig festgelegt werden, ob es sich hier tatsächlich um Gedächtnis-T-Zellen handelt. Die sehr hohe Expression von CD44, wie sie auf den Gedächtnis-T-Zellen der Kontrollmäuse



erreicht werden, wurde auf den T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse nicht erreicht. Jedoch konnte auch in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen eine CD44<sup>hoch</sup> Population, die wahrscheinlich Gedächtnis-T-Zellen und aktivierten T-Zellen beinhaltet, deutlich von der CD44<sup>niedrig</sup> Population der naiven T-Zellen abgetrennt werden. CD44 kann von der Zelloberfläche abgespalten (Hartmann et al., 2015; Okamoto et al., 1999). Möglicherweise wird dies durch die andauernden konstitutiven CD30-Signale ausgelöst.

Deshalb könnte es sich bei der T<sub>CM</sub>-Population der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse um T<sub>CM</sub> mit verminderter CD44-Expression auf der Zelloberfläche handeln. Da aktivierte T-Zellen, wie auch T<sub>EM</sub> als CD62L<sup>niedrig</sup> und CD44<sup>hoch</sup> definiert sind (Gasper et al., 2014; Yang et al., 2011), kann nicht unterschieden werden, ob der erhöhte prozentuale Anteil an CD62L<sup>niedrig</sup>CD44<sup>hoch</sup> Zellen tatsächlich einen erhöhten Anteil an Effektor Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>EM</sub>) widerspiegelt. Da die T-Zellen der LM1/CD30//CD4Cre Mäuse einen aktivierten Phänotyp aufwiesen (wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert), ist eher anzunehmen, dass es sich bei dieser Population um eine Mischung aus aktivierten T-Zellen und T<sub>EM</sub> Zellen handelte.

Bei jungen CD30//CD4Cre-Mäusen konnten, im Vergleich zu jungen Kontrollmäusen, keine signifikanten Unterschiede, weder bei den CD4<sup>+</sup>, noch bei den CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellpopulationen, festgestellt werden. Jedoch nahm in den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen sowohl bei den CD8<sup>+</sup> als auch bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Anteil der naiven T-Zellen ab. Dafür waren die Anteile von CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> und von CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>niedrig</sup>CD44<sup>hoch</sup> T-Zellen im Vergleich zu gealterten Kontrollmäusen erhöht. Auch hier kann nicht genau unterschieden werden, ob es sich bei der CD62L<sup>niedrig</sup>CD44<sup>hoch</sup> Population um aktivierte T-Zellen, oder um T<sub>EM</sub>, handelt, da auch die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der gealterten CD30//CD4Cre-Mäuse einen aktivierten Phänotyp aufwiesen (wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert).

Während in jungen CD30//CD4Cre-Mäusen bereits eine Expansion der T-Zellen zu beobachten war, konnte eine verstärkte T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung nur in gealterten Mäusen beobachtet werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass CD30-Signale zwar ausreichen, um eine verstärkte Proliferation der T-Zellen zu induzieren, jedoch zusätzliche Signale, z.B. TZR-Signale, nötig sind, um eine Differenzierung der T-Zellen zu Gedächtnis-T-Zellen auszulösen. Die geringe Wahrscheinlichkeit, dass eine CD30-exprimierende T-Zelle auf eine Antigen-präsentierende Zelle trifft und zeitgleich CD30-Signale erhält, könnte erklären, dass in den jungen CD30//CD4Cre-Mäusen noch keine erhöhten Anteile von Gedächtnis-T-Zellen zu detektieren waren. Eine Zunahme von CD30-L-exprimierenden Zellen in gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen könnte die Wahrscheinlichkeit

einer gleichzeitigen CD30- und TZR-Stimulation erhöhen und somit die verstärkte Differenzierung zu  $T_{CM}$  und wahrscheinlich auch zu  $T_{EM}$  erklären.

Um die Verteilung von  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen und in den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen abschließend bewerten zu können, müssten Marker gefunden werden, die es erlauben zwischen aktivierten T-Zellen und  $T_{EM}$  zu unterscheiden. Die Arbeitsgruppe um D. Busch zeigte, dass bei murinen  $CD8^+$  T-Zellen anhand der Expressionslevel von CD127 zwischen aktivierten Effektor-T-Zellen ( $CD127^{niedrig}CD62L^{niedrig}$ ) und  $T_{EM}$  ( $CD127^{hoch}CD62L^{niedrig}$ ) unterschieden werden kann (Huster et al., 2006). Dieser Marker könnte, zumindest für  $CD8^+$  T-Zellen, herangezogen werden um in den LMP1/CD30//CD4Cre- und den CD30//CD4Cre-Mäusen die Anteile von aktivierten und  $T_{EM}$  unter den  $CD62L^{niedrig}CD44^{hoch}$  Zellen zu bestimmen. Da  $T_{CM}$ , im Vergleich zu Effektor-T-Zellen und  $T_{EM}$ , relativ langlebig sind (Tanel et al., 2009), könnte außerdem durch adoptive Transferexperimente in T-Zell-defiziente Mäuse untersucht werden, ob es sich bei der  $T_{CM}$ -Population der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse wirklich um  $T_{CM}$  handelt. Überleben die  $T_{CM}$  der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse nach dem Transfer genauso lange wie die transferierten  $T_{CM}$  von Kontrollmäusen, handelt es sich wahrscheinlich um die gleiche Zellpopulation.

Obwohl nicht endgültig geklärt werden konnte, ob CD30-Signale die Differenzierung zu  $T_{EM}$  begünstigen, sprechen unsere Daten für einen positiven Effekt von CD30-Signalen auf die Differenzierung zu  $T_{CM}$ . Unsere Daten unterstützen somit die Hypothese, dass CD30-Signale einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von Gedächtnis-T-Zellen haben.

#### 4.4 CD30-Signale führen zur Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen

Um genauer herauszufinden, in wieweit CD30-Signale zur Aktivierung von T-Zellen beitragen, wurden T-Zellen der transgenen Mäuse auf die Expression von Aktivierungsmarkern hin untersucht.

Bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen konnten wir eine Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69, PD-1, CD95 und CD44 auf den  $CD4^+$  und den  $CD8^+$  T-Zellen feststellen. Um genauer zu untersuchen, ob die Hochregulation dieser Aktivierungsmarker ein direkter Effekt des konstitutiven CD30-Signals war, wurden  $CD4^+$  T-Zellen von LMP1/CD30//CD4CreER<sup>T2</sup>-Mäusen kultiviert. Die Expression des Reporters hCD2 und somit

höchstwahrscheinlich auch von LMP1/CD30 wird in diesen Zellen erst nach Zugabe von Tamoxifen und gleichzeitiger Stimulation induziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionslevel von CD69, PD-1, CD44 und CD95 auf den  $\text{hCD2}^+\text{LMP1/CD30}^-$  im Vergleich zu  $\text{hCD2}^+\text{LMP1/CD30}^- \text{CD4}^+$  T-Zellen erhöht waren. Dies zeigt, dass die verstärkte Expression von CD69, PD-1, CD44 und CD95 durch konstitutive CD30-Signale ausgelöst wird. In Gegensatz zu den  $\text{CD4}^+$  T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse, bei denen CD69 nur auf einer Teilpopulation exprimiert wurde, konnte hier eine erhöhte Expression von CD69 auf allen  $\text{hCD2}^+\text{LMP1/CD30}^+$  Zellen detektiert werden. Da bei den in vitro Experimenten die Zellen mit  $\alpha\text{-CD3}$ - und  $\alpha\text{-CD28}$ -Antikörpern stimuliert wurden, könnte dies darauf hinweisen, dass LMP1/CD30 nur in Kombination mit TZR-Signalen zur Hochregulation von CD69 führt.

In jungen CD30//CD4Cre-Mäusen waren keine Unterschiede hinsichtlich der T-Zell-spezifischen Expression von CD69, PD-1, CD44 und CD95 im Vergleich zu jungen Kontrollmäusen erkennbar. Wahrscheinlich findet hier nur auf wenigen CD30-exprimierende T-Zellen eine Interaktion mit dem CD30-Liganden statt, so dass die möglicherweise wenigen aktivierten T-Zellen im Histogramm nicht detektiert werden konnten. In gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen waren jedoch auf einem Teil der  $\text{CD4}^+$  T-Zellen diese Aktivierungsmarker verstärkt exprimiert. Hier kommt es wahrscheinlich durch die vermehrt vorhandenen CD30-L-exprimierenden Zellen öfter zur Interaktion von CD30-exprimierenden  $\text{CD4}^+$  T-Zellen mit dem Liganden, was in diesen Zellen zur Hochregulation der untersuchten Aktivierungsmarker führt. Inwiefern für die verstärkte Expression der Aktivierungsmarker neben den CD30-Signalen noch zusätzliche Signale, z.B. über den TZR, nötig sind, konnte in diesen Mausmodellen nicht abschließend geklärt werden. Da in Kultur die Tamoxifen-abhängige Induktion von LMP1/CD30 auf den  $\text{CD4}^+$  T-Zellen der LMP1/CD30//CD4CreER<sup>T2</sup>-Mäuse nur bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit  $\alpha\text{-CD3}$  und  $\alpha\text{-CD28}$  stattfand, konnte auch dieses Experiment nicht zur Klärung dieser Frage beitragen.

Um herauszufinden, ob CD30-Signale alleine oder in Kombination mit TZR-Signalen zur Aktivierung der T-Zellen führen, könnte der CD30-Rezeptor der CD30-exprimierenden T-Zellen gezielt in vitro mit und ohne gleichzeitige TZR-Signale stimuliert werden. Während die Stimulation des humanen CD30-Rezeptors durch  $\alpha\text{-CD30}$ -Antikörper bereits von einigen Arbeitsgruppen erfolgreich durchgeführt wurde (Hirsch et al., 2008; Hirsch et al., 2013; Mir et al., 2000; Nishikori et al., 2005), sind die Reagenzien für die Stimulation des murinen CD30-Rezeptors weniger gut etabliert. In eigenen Experimenten zu Beginn meiner

Doktorarbeit (und Beobachtung anderer Arbeitsgruppen) konnte eine Stimulation des murinen CD30-Rezeptors durch die verfügbaren, agonistischen  $\alpha$ -CD30-Antikörper, wie auch durch den CD30-Liganden, nicht erreicht werden. Da inzwischen weitere CD30-Liganden und  $\alpha$ -CD30-Antikörper gegen den murinen CD30-Rezeptor auf dem Markt sind, könnten diese Experimente mit diesen neueren Produkten wiederholt werden. Falls dies nicht zum Erfolg führt, könnte versucht werden, den murinen CD30-Rezeptor mit einer CD30-Liganden-exprimierenden Zelllinie zu stimulieren.

#### 4.5 Konstitutive CD30-Signale führen zur Erschöpfung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Obwohl die Expression der Aktivierungsmarker auf CD4<sup>+</sup> und auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse erhöht war, konnte in Milz und Lymphknoten nur eine Expansion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden, während die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen drastisch reduziert war. Durch dauerhafte Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wie es oft bei chronischen Virusinfektionen oder einigen Tumoren der Fall ist, kann es zur Erschöpfung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommen, was letztendlich zur Apoptose der CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt (Schietering und Greenberg, 2014; Wherry, 2011). Eine Erschöpfung und Depletion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde beispielsweise bei chronischen Infektionen mit dem Hepatitis B und C Virus beschrieben (Schmidt et al., 2013; Ye et al., 2015). Da auch LMP1/CD30-exprimierende T-Zellen dauerhaft aktiviert sind, haben wir vermutet, dass die reduzierte Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz und im Lymphknoten der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse ebenfalls auf einen Erschöpfungszustand zurückzuführen war. Der Erschöpfungszustand der CD8<sup>+</sup> T-Zellen geht einher mit der Expression inhibitorischer Rezeptoren, wie z.B. PD-1, TIM-3 und KLRG-1 (Schietering und Greenberg, 2014; Wherry und Kurachi, 2015). PD-1 wird zwar auch auf aktivierten Zellen verstärkt exprimiert, erschöpfte CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind jedoch durch eine sehr hohe Expression dieses Rezeptors charakterisiert (Jiang et al., 2015; Sharpe et al., 2007). Um herauszufinden, ob die verminderte Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz der LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse auf einen Erschöpfungszustand der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen ist, haben wir die Expressionslevel von „Erschöpfungs-Markern“ auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Ca. 40% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse wiesen eine sehr hohe Expression von PD-1 (PD-1<sup>sehr hoch</sup>) und eine erhöhte Expression der Moleküle TIM-3 und KLRG-1 auf. Eine Subpopulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert somit typische Marker für erschöpfte T-Zellen. Der Grund, dass nur eine Subpopulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen diese Erschöpfungsmarker exprimierten, könnte darauf hinweisen, dass für die

Ausbildung des Erschöpfungszustandes noch zusätzliche Aktivierungs-Signale notwendig sind. Auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen der gealterten CD30//CD4Cre-Mäuse konnte keine erhöhte PD1-Expression nachgewiesen werden, auch war die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz im Vergleich zu Kontrollmäusen nicht reduziert. Dies weist darauf hin, dass dauerhafte CD30-Signale für den Erschöpfungszustand nötig sind. CD30-Signale, die nur zeitweise durch die Interaktion mit dem CD30-Liganden ausgelöst werden, scheinen nicht zum Erschöpfungszustand von T-Zellen zu führen.

## 4.6 Der Einfluss von CD30-Signalen auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen

### 4.6.1 Konstitutive CD30-Signale führen zur Aktivierung von Akt, Jnk und p38

Wie oben beschrieben, führte das konstitutive CD30 Signal in T-Zellen zu einer Abnahme der naiven T-Zellen, einer Zunahme von aktivierten T-Zellen und wahrscheinlich auch zur Zunahme von Gedächtnis-T-Zellen. Die Analyse von T-Zell-spezifischen FoxO1-defizienten Mäusen zeigte, dass das Fehlen des Transkriptionsfaktors FoxO1 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einem ähnlichen Phänotyp führt (Ouyang et al., 2009). In Proteinextrakten von CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse konnte kein FoxO1 detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die LMP1/CD30-Expression zur Herunterregulation von FoxO1 führte. Folgende Phänotypen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse könnten dadurch erklärt werden: Der aktivierte Zustand der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die verminderten Anteile von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und die wahrscheinlich verstärkte Bildung von CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen.

FoxO1 wird durch die Proteinkinase Akt phosphoryliert, dies führt zur proteasomalen Degradation von FoxO1 im Zytoplasma. Findet keine Phosphorylierung von FoxO1-Proteinen statt, wandern diese in den Zellkern und können dort als Transkriptionsfaktoren wirken (Martins et al., 2015; Tzivion et al., 2011). Die Level von phosphoryliertem Akt in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse waren signifikant erhöht. Die Stimulation der LMP1/CD30-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen führte, im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Kontrollmäusen, zu einer stärkeren Aktivierung des Akt-Signalweges. Dies könnte darauf hinweisen, dass konstitutive CD30-Signale in CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Aktivierung von Akt führen, und die Phosphorylierung von Akt, die über die Stimulation anderer Rezeptoren ausgelöst wird, verstärken. Über den Einfluss von CD30-Signalen auf den Akt Signalweg ist bisher nur wenig bekannt. Es wurde beschrieben, dass in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, einem B-Zell-Lymphom, CD30-Signale zur Phosphorylierung von Akt führen (Georgakis et al., 2006). Die Daten deuten darauf hin, dass CD30-Signale nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in

murinen, primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Aktivierung des Akt Signalwegs führen. Außer der erhöhten Akt-Aktivität konnte in LMP1/CD30-exprimierenden T-Zellen auch eine erhöhte Aktivität von Jnk und p38 nachgewiesen werden, während für pErk keine erhöhten Level detektiert werden konnten. Da FoxO1 auch durch die MAP-Kinase p38 phosphoryliert werden kann (Asada et al., 2007; Shankar et al., 2008), was ebenfalls zur Degradation von FoxO1 führt, könnte die starke Reduktion des FoxO1-Proteins in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen dieser Mäuse somit zusätzlich durch aktiviertes p38 ausgelöst werden. Es sollte noch untersucht werden, ob die FoxO1-Level in den LMP/CD30-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen schon auf transkriptioneller Ebene reduziert sind.

#### 4.6.2 Konstitutive CD30-Signale fördern die Differenzierung zur T<sub>H</sub>1-Linie

Ältere Studien zeigten, dass CD30-Signale in aktivierten T-Zellen die Sekretion T<sub>H</sub>2-spezifischer Zytokine auslösen (Del Prete et al., 1995), während neuere Daten darauf hinweisen, dass CD30-Signale eine Rolle bei der T<sub>H</sub>1 Immunantwort spielen (Gaspal et al., 2008; Tang et al., 2008). Experimente mit CD30-Ligand-knock-out-Mäusen zeigten, dass nach Infektion der Mäuse mit *Mycobacterium bovis* die Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, deutlich reduziert ist. Da IFN- $\gamma$  von T<sub>H</sub>1-Zellen sekretiert wird, deutet dies darauf hin, dass die Interaktion des CD30-Rezeptors mit dem CD30-Liganden für die Ausbildung der T<sub>H</sub>1-Immunantwort von Bedeutung ist (Tang et al., 2008). Unsere Daten unterstützen diese Vermutung. LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse wiesen einen höheren Anteil TIM-3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf als Kontrollmäuse, wohingegen TIM-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht nachgewiesen werden konnten. TIM-3 ist in murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein typischer T<sub>H</sub>1-Zell-Marker (Ge et al., 2015; Sabatos et al., 2003), wohingegen TIM-1 nur auf T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert wird (Curtiss et al., 2012). Die Stimulation mit PMA und Ionomycin führte bei den LMP1/CD30-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen, im Vergleich zu Kontroll-CD4<sup>+</sup> T-Zellen, zu erhöhten Anteilen IFN- $\gamma$ -produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Auch ohne zusätzliche Aktivierung durch diese beiden Stimuli war der Anteil IFN- $\gamma$  produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen höher als bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, in Kombination mit konstitutiven CD30-Signalen, die Differenzierung zu T<sub>H</sub>1-Zellen fördert.

Die Signalwege, die über LMP1/CD30 induziert werden, könnten für diese Differenzierung verantwortlich sein. Die Phosphorylierung von Erk fördert in CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Entstehung von T<sub>H</sub>2-Zellen, wohingegen phosphoryliertes Jnk die Bildung von T<sub>H</sub>2-Zellen unterdrückt

und die Generierung von  $T_H1$ -Zellen begünstigt (Agrawal et al., 2006; Rincon, 2001; Yamashita et al., 2005). Auch die Aktivierung des p38-Signalweges ist für die Entstehung von  $T_H1$ -Zellen und deren Produktion von  $IFN-\gamma$ , essentiell (Rincon und Davis, 2009; Yang et al., 2010). Die erhöhte p38 und Jnk Aktivität, aber basale Erk Aktivität, die in LMP1/CD30-exprimierenden  $CD4^+$  T-Zellen beobachtet wurde, könnte somit für die bevorzugte Differenzierung in Richtung  $T_H1$ -Subtyp verantwortlich sein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von FoxO1-defizienten Zellen mit PMA und Ionomycin, im Vergleich zu Kontroll- $CD4^+$  T-Zellen, zu erhöhten Anteilen  $IFN-\gamma$ -produzierender  $CD4^+$  T-Zellen führt (Ouyang et al., 2009). Somit könnte in den  $CD4^+$  T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse die FoxO1-Defizienz, welche vermutlich durch die CD30-Signale ausgelöst wird, auch für die bevorzugte Differenzierung zu  $T_H1$ -Zellen verantwortlich sein.

#### 4.6.3 Fördern konstitutive CD30-Signale die Bildung von $FoxP3^+CD4^+$ T-Zellen?

Murine regulatorische T-Zellen sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert (Li und Zheng, 2015). Meist sind diese Zellen  $FoxP3^+CD4^+CD25^+$ , es wurde jedoch auch eine Population von  $FoxP3^+CD4^+CD25^-$  Tregs beschrieben, deren Funktion und Entstehung nicht genau bekannt ist (Nie et al., 2015; Zelenay et al., 2005). In den Milzen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse konnten erhöhte Anteile von  $FoxP3^+CD4^+CD25^-$  regulatorischen T-Zellen detektiert werden, während die Anteile von  $FoxP3^+CD4^+CD25^+$  Tregs mit denen von Kontrollmäusen vergleichbar waren. Es ist nicht klar, ob dies ein direkter Effekt des konstitutiven CD30-Signals ist. Bei einigen Virusinfektionen wurde eine Expansion von  $CD4^+$  Tregs beschrieben (Punkosdy et al., 2011; Veiga-Parga et al., 2013). Da die T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre Mäuse einen aktivierten Phänotyp aufweisen und das konstitutive CD30-Signal in  $CD8^+$  T-Zellen sogar zur Erschöpfung führt, könnte dies zu einer vermehrten Bildung von  $FoxP3^+$  regulatorischen T-Zellen führen, um einer übermäßigen Aktivierung des Immunsystems entgegenzuwirken. Ob CD30-Signale direkt in die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen eingreifen, könnte durch Kreuzung von LMP1/CD30<sup>fSTOP</sup>-Mäusen mit FoxP3Cre-Mäusen untersucht werden. Durch die FoxP3-spezifische Expression von LMP1/CD30 könnte analysiert werden, ob es in diesen Mäusen zu einer Expansion von regulatorischen T-Zellen kommt und ob diese nur die  $FoxP3^+CD4^+CD25^-$  Zellpopulation betrifft.

#### 4.6.4 CD30-Signale inhibieren die Entwicklung von T<sub>FH</sub>-Zellen

Welche Rolle CD30-Signale bei der Differenzierung von follikulären T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>-Zellen) spielen, ist bisher noch nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass konstitutive CD30-Signale die Bildung von T<sub>FH</sub>-Zellen inhibieren. In den Peyerschen Plaques der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse konnten, ebenso wie nach T-Zell-abhängiger Immunisierung dieser Mäuse, keine T<sub>FH</sub>-Zellen detektiert werden. Durch das Fehlen der T<sub>FH</sub>-Zellen war auch die Ausbildung von Keimzentren nicht mehr möglich. Bei den CD30//CD4Cre-Mäusen war die Keimzentrumsbildung nach T-Zell-abhängiger Immunisierung zwar nicht wie bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen komplett blockiert, jedoch waren die Anteile von T<sub>FH</sub>- und Keimzentrums-B-Zellen im Vergleich zu immunisierten Kontrollmäusen reduziert. Dies könnte darauf hinweisen, dass in den immunisierten CD30//CD4Cre-Mäusen die Interaktion von CD30-exprimierenden T-Zellen mit CD30-L-exprimierenden Zellen ebenfalls zu einem Block in der Differenzierung zu T<sub>FH</sub>-Zellen führte und es infolge dessen zu verminderten Anteilen an T<sub>FH</sub> und Keimzentrums-B-Zellen kam.

T<sub>FH</sub>-Zellen sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors Bcl-6 charakterisiert. In T<sub>FH</sub>-Zellen führt die Expression von Bcl-6 zur Expression des Oberflächenmoleküls CXCR5, was die Wanderung der T-Zellen an die B-Zellzone induziert (Crotty, 2014; De Silva und Klein, 2015). Eine Möglichkeit wäre, dass CD30-Signale die Expression von Bcl-6 inhibieren. Dadurch kommt es nicht zur Expression von CXCR5, wodurch die Wanderung der T-Zellen zur B-Zellzone und die Entstehung von T<sub>FH</sub>-Zellen unterbunden werden. Ebenso wäre es denkbar, dass CD30-Signale die Expression von Blimp-1 erhöhen. Der Transkriptionsfaktor Blimp-1 ist ein Antagonist von Bcl-6 und inhibiert die Differenzierung zu T<sub>FH</sub>-Zellen (Crotty, 2014; Johnston et al., 2009). Um diese Vermutung zu unterstützen, müsste die Expression von Blimp-1 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen von LMP1/CD30//CD4Cre- und Kontrollmäusen verglichen werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob die LMP1/CD30-Expression einen Einfluss auf die ICOS-Expression hat. Signale über den ICOS-Rezeptor sind für die Differenzierung von T<sub>FH</sub>-Zellen essentiell. In ICOS<sup>-/-</sup>, oder ICOS-L<sup>-/-</sup> Mäusen ist keine Entwicklung von T<sub>FH</sub>-Zellen möglich (Nurieva et al., 2008; Weinstein et al., 2014). Es könnte möglich sein, dass CD30-Signale die Hochregulation von ICOS auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen verhindern, so dass es nicht zur Entstehung von T<sub>FH</sub>-Zellen kommen kann. Wir konnten zeigen, dass CD30-Signale die Entstehung von T<sub>FH</sub>-Zellen inhibieren, jedoch muss der Mechanismus über den diese Inhibition erfolgt noch untersucht werden.



## 4.7 LMP1/CD30-exprimierende T-Zellen haben einen Einfluss auf die B-Zellen

Obwohl wir eindeutig zeigen konnten, dass in LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen das Transgen nicht in B-Zellen exprimiert wird, hatten die B-Zellen dieser Mäuse einen stark veränderten Phänotyp. Die LMP1/CD30-exprimierenden T-Zellen schienen einen stark supprimierenden Effekt auf B-Zellen zu haben. So waren im Serum der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse fast keine klassengewechselten Antikörper und deutlich weniger IgM-Antikörper als im Serum von Kontrollmäusen vorhanden. Nach T-Zell-unabhängiger und -abhängiger Immunisierung konnten nur geringe Mengen von antigenspezifischen IgM, und nahezu keine IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Da IgM hauptsächlich von Marginalzonen-B-Zellen und B1-Zellen sekretiert wird (Cerutti et al., 2013; Martin et al., 2001), haben wir diese Zell-Populationen näher untersucht. In den Milzen der LMP1//CD30//CD4Cre-Mäuse waren in der Marginalzone nur wenige Marginalzonen-B-Zellen vorhanden. Auch konnte eine starke Reduktion von B1-Zellen im Bauchraum dieser Mäuse festgestellt werden. Dies könnte die verminderten IgM-Konzentrationen im Blut der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse erklären. Die fehlende Keimzentrumsreaktion kann die stark erniedrigten IgG-Titer erklären. Warum die LMP1/CD30-exprimierenden T-Zellen zu der starken Reduktion von Marginalzonen-B-Zellen und B1-Zellen führte, konnten wir im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Um zu untersuchen, ob die Funktion der B-Zellen nach ex vivo Isolation wieder hergestellt werden kann, haben wir in vitro die Funktion der B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse untersucht. Die ex vivo isolierten B-Zellen konnten ähnlich wie Kontroll-B-Zellen mit LPS zur Plasmazell-Differenzierung angeregt werden. Die  $\alpha$ -IgM und  $\alpha$ -CD40 Stimulierung führte zur Hochregulation von CD86, was darauf hindeutet, dass diese B-Zellen ähnlich wie Kontroll-B-Zellen in vitro aktiviert werden können. Dies wies darauf hin, dass die B-Zellen in Kultur voll funktionsfähig sind. Da hCD2 und LMP1/CD30 nur auf T-Zellen dieser Mäuse, jedoch nicht auf B-Zellen exprimiert wird, ist anzunehmen, dass die Dysfunktion der B-Zellen in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen in direkter oder indirekter Weise von den T-Zellen ausgehen muss. Sobald die B-Zellen von den T-Zellen separiert werden, scheinen die B-Zellen wieder ihre volle Funktion aufnehmen zu können. Möglicherweise ist der chronische Aktivierungszustand der T-Zellen für den Funktionsverlust der B-Zellen verantwortlich. Hinweise für diese Hypothese liefern einige Publikationen, die ähnliche Veränderungen der B-Zellen bei chronischen T-Zell-assoziierten Virusinfekten beschreiben. Eine kürzlich erschienene Studie zeigte, dass in Affen die chronische Infektion mit dem SI-Virus (*simian immunodeficiency virus*), durch einen unbekannten Mechanismus, zum Verlust der Marginalzonen B-Zellen

führt (Demberg et al., 2015). Die verminderte Expression von CD21, die wir in B-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse detektieren konnten, wurde ebenfalls bei B-Zellen von Menschen mit einer chronischen Infektion des HI-Virus (*human immunodeficiency virus*) beobachtet und als Anzeichen einer „Infektions-assoziierten B-Zell Dysfunktion“ beschrieben (Sciaranghella et al., 2012; Zhang et al., 2015).

Diese Publikationen zeigen, dass es bei chronischen Virusinfektionen zu ähnlichen Veränderungen der B-Zellen kommen kann, wie es auch bei den LMP/CD30//CD4Cre-Mäusen beobachtet werden konnte. Chronische Virusinfektionen können, ähnlich wie das LMP1/CD30 Transgen zu einer konstitutiven Aktivierung von T-Zellen führen. Interessanterweise konnte bei einigen HIV-Patienten erhöhte CD30-Level im Serum nachgewiesen werden, was auf eine erhöhte Anzahl CD30-exprimierender Zellen hindeutet (Kadin, 2000; Rizzardi et al., 1996). Die publizierten und unsere Daten könnten darauf hinweisen, dass eine langanhaltende CD30-Stimulation von T-Zellen zu einer Inhibition der B-Zellen führt.

#### **4.8 CD30-Signale in T-Zellen führen nicht zur Tumorentstehung**

Im Gegensatz zu einigen anderen T-Zelltumoren sind Zellen des anaplastischen großzelligen Lymphomen (ALCL) durch sehr hohe CD30-Expressionslevel gekennzeichnet (Hapgood und Savage, 2015; Schirrmann et al., 2014; Stein et al., 2000). Diese Beobachtung führte zur Annahme, dass deregulierte CD30-Signale in ALCL Zellen Einfluss auf die Tumorentstehung haben könnten. Um zu untersuchen, ob verstärkte CD30-Signale einen Einfluss auf die Pathogenese von ALCL haben, wurden in dieser Arbeit die CD30//CD4Cre- und die LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse über mehrere Monate beobachtet und auf Anzeichen einer Tumorentstehung hin untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Mausstämme nach einigen Monaten pathologische Auffälligkeiten zeigten, die ein Töten der Tiere aufgrund der Tierschutzbestimmungen nötig machten. Dies war bei den gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen nach ca. 5-10 Monaten, bei den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen zwischen 6 und 14 Monaten der Fall. Bei beiden Mausstämmen konnte zu diesen Zeitpunkten eine Splenomegalie und eine T-Zellexpansion in der Milz festgestellt werden. Die Milzgewichte der gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse waren jedoch im Vergleich zu jungen Mäusen dieser Mauslinie etwas geringer, was vermutlich auf die reduzierten B-Zellzahlen in der Milz zurückzuführen war. Bei den gealterten CD30//CD4Cre-Mäusen war die Splenomegalie und die Expansion der

Lymphozyten im Vergleich zu jungen Mäusen dieses Genotyps deutlich stärker ausgeprägt. Die histologische Begutachtung der Milzen beider transgenen Mausstämme durch die Pathologin L. Quintanilla-Fendt (Universitätsklinikum Tübingen, Mauspathologie) ergab keinen Hinweis, dass die gealterten Mäuse ein T-Zell-Lymphom entwickelt hatten. In den Milzen beider Mauslinien befanden sich die T-Zellen noch im Follikel. Im Knochenmark der beiden Mausstämme konnte keine T-Zellexpansion festgestellt werden (nicht gezeigte Daten). Beide Befunde sprechen eher gegen die Ausbildung eines T-Zell-Lymphoms. Eine konkrete Diagnose für die erkrankten, gealterten Mäuse konnte jedoch nicht gestellt werden. Um endgültig sicherzugehen, dass es in diesen Mäusen nicht zur Bildung eines T-Zelltumors kam, müsste untersucht werden, ob es sich bei den T-Zellen der gealterten, transgenen Mäuse um eine monoklonale T-Zellpopulation handelte. Das Ausbleiben einer Lymphom-Entstehung in den gealterten transgenen Mäusen könnte folgende Ursachen haben: (i) Die meisten gealterten transgenen Mäuse mussten im Alter von 6-12 Monaten getötet werden. Denkbar wäre, dass die Mäuse getötet wurden, noch bevor es zur Tumorentstehung kommen konnte. (ii) Die CD30-Expression spiegelt nur ein bestimmtes Differenzierungsstadium des ALCL wieder und hat keinen direkten Einfluss auf die Lymphom-Entstehung. Ein Hinweis für diese Hypothese könnte sein, dass die Stimulation von CD30 auf ALCL Zellen durch einen  $\alpha$ -CD30-Antikörper zur Apoptose der ALCL Zellen (Mir et al., 2000) bzw. zur Inhibierung des Zellzyklus führt (Ansell et al., 2007; Levi et al., 2001). Diese Daten sprechen dafür, dass CD30-Signale die Tumorentstehung eher negativ beeinflussen.

In unseren Mausmodellen führten CD30-Signale nicht zur Tumorentstehung. Wir konnten jedoch zeigen, dass durch den CD30-Rezeptor aktivierende Signale an die T-Zellen vermittelt werden, die zur Aktivierung der T-Zellen und vermutlich in Kombination mit anderen Signalen sogar zur Erschöpfung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen. Da bei einigen chronischen Viruserkrankungen oft vermehrt CD30<sup>+</sup>-Zellen vorhanden sind und es ebenfalls oft zur Erschöpfung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen kommt, könnte der CD30-Rezeptor ein Zielmolekül für die Entwicklung neuer Behandlungsansätze bei chronischen Viruserkrankungen sein. Die konstitutiven CD30-Signale in den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen inhibierten die Bildung von T<sub>FH</sub>-Zellen, ebenfalls war in diesen Mäusen ein Funktionsverlust der B-Zellen, mit stark verminderten Antikörpertitern zu beobachten. Die Erforschung von Antikörpermangel-syndromen konzentriert sich meist auf die B-Zellen, jedoch zeigen unsere Daten, dass die Forschung auch auf T-Zellen, insbesondere auf CD30-exprimierende T-Zellen, ausgeweitet werden sollte.

## 5 Zusammenfassung

Eine hohe Expression des CD30-Rezeptors ist bei einigen Tumorarten, wie z.B. beim anaplastisch-großzelligen Lymphom, einem T-Zell-Lymphom, zu beobachten. Da die CD30-Expression physiologisch nur auf sehr wenige, aktivierte Zellen beschränkt ist, wurden die meisten Arbeiten zur Aufklärung der Funktion und der Signalweiterleitung des CD30-Rezeptors an Tumorzelllinien durchgeführt. Um die Rolle von CD30 in primären T-Lymphozyten untersuchen zu können, wurden in unserer Arbeitsgruppe zwei transgene Mausstämme generiert, die LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup> und die CD30<sup>flSTOP</sup> Mäuse (Fiedler, 2011). Bei Expression des LMP1/CD30-Fusionsproteins kommt es, durch Eigenaggregation des LMP1-Anteils, zu Liganden-unabhängigen, konstitutiven CD30-Signalen. Bei CD30-exprimierenden Zellen ist zur Aktivierung des CD30-Signals die Interaktion mit Zellen nötig, die den CD30-Liganden exprimieren.

Ich habe in den ersten beiden Teilen meiner Arbeit untersucht, welchen Einfluss CD30-Signale auf die Aktivierung und Differenzierung von murinen T-Zellen haben. Hierzu wurden LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup> und CD30<sup>flSTOP</sup> Mäuse mit CD4Cre Mäusen gekreuzt, um eine T-Zell-spezifische Expression von LMP1/CD30, bzw. von CD30 zu erreichen. Die konstitutiven, sowie auch ligandenabhängigen CD30-Signale führten auf T-Zellen zur erhöhten Expression von Aktivierungsmarkern und möglicherweise auch zur verstärkten Bildung von Gedächtnis-T-Zellen. Durch die anhaltenden CD30-Signale kam es bei den LMP1/CD30//CD4Cre Mäusen sogar zur teilweisen Erschöpfung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, was mit der Expression spezifischer „Erschöpfungs“-Marker und verminderten CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen in der Milz einherging. Ein andauerndes CD30-Signal in CD8<sup>+</sup> T-Zellen scheint somit Einfluss auf die Entstehung von erschöpften CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu haben. Ich konnte zeigen, dass in CD4<sup>+</sup> T-Zellen der LMP1/CD30//CD4Cre-Mäuse, im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Kontrollmäuse, kein FoxO1 detektierbar war. Vermutlich wird FoxO1 durch die erhöhte Aktivität des Akt- und p38-Signalwegs abgebaut. Die stark verminderten FoxO1-Level könnten für den aktivierten Phänotyp der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie für die möglicherweise verstärkte Bildung von Gedächtnis-T-Zellen verantwortlich sein. Die Generierung von T<sub>H</sub>1-Zellen wird in CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Aktivität der Jnk- und des p38-Signalweges gefördert. Da diese beiden MAP-Kinase-Signalwege in den LMP1/CD30-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen verstärkt aktiviert waren, habe ich untersucht, ob konstitutive CD30-Signale die Bildung von T<sub>H</sub>1-Zellen fördern. Dies konnte bei den LMP1/CD30-exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die teilweise Expression des T<sub>H</sub>1-Markers TIM-3 und eine erhöhte IFN- $\gamma$

Sekretion, besonders nach Stimulation dieser Zellen, gezeigt werden. Diese Daten implizieren, dass CD30-Signale in Kombination mit einer Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermutlich die Bildung von T<sub>H</sub>1-Zellen fördern. Bisher war nicht bekannt, ob es einen Zusammenhang von CD30-Signalen und der Entstehung von follikulären T-Helferzellen gibt. Ich konnte zeigen, dass konstitutive CD30-Signale in CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Entstehung von follikulären T-Helferzellen inhibieren. In Folge dessen war auch die Entstehung von Keimzentren und die Bildung Antigen-spezifischer Antikörper nicht mehr möglich. Wir nehmen an, dass der aktivierte Zustand der T-Zellen, der durch die konstitutiven CD30-Signale ausgelöst wurde, bei den LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen zu direkten oder indirekten Auswirkungen auf die B-Zellen führte. So waren die Antikörpertiter in den Mäusen stark reduziert, was möglicherweise auf das Fehlen von Marginalzonen-B-Zellen und B1-Zellen zurückzuführen war. Auch die T-Zell-unabhängige Immunantwort war in diesen Mäusen gestört. Bei den gealterten LMP1/CD30//CD4Cre-Mäusen kam es sogar zu einer Depletion der B-Zellen in der Milz.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde im Langzeitversuch untersucht, ob LMP1/CD30//CD4Cre- bzw. CD30//CD4Cre-Mäuse im Laufe der Zeit T-Zelltumoren entwickeln. Obwohl gealterte Mäuse beider transgener Mauslinien pathologische Auffälligkeiten zeigen, die ein Abtöten der Tiere nötig machten, gab es keine Anzeichen für eine Tumorentstehung.

## 6 Summary

In some tumor entities like e.g. the T cell lymphoma “anaplastic large cell lymphoma”, the CD30 receptor is highly expressed. Since the expression of CD30 is restricted to very few activated cells, most studies that aimed at identifying the function and signal transduction of CD30 were performed in tumor cell lines. In order to analyze the role of CD30 in primary T lymphocytes, two transgenic mouse strains were generated in our group, namely LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup> and CD30<sup>flSTOP</sup> mice (Fiedler, 2011). Upon expression of the LMP1/CD30 fusion protein, a self-aggregation of the LMP1 region causes a ligand-independent, constitutive CD30 signaling. In cells expressing CD30 alone, the activation of CD30 signaling requires an interaction with cells expressing the CD30 ligand.

In the first two parts of my thesis I analyzed the influence of CD30 signaling on the activation and differentiation of murine T cells. Therefore, LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup> and CD30<sup>flSTOP</sup> mice were cross-bred with CD4Cre mice to achieve a T cell-specific expression of LMP1/CD30 or CD30. The constitutive as well as the ligand-dependent CD30 signals led to an increased

expression of activation markers on T cells and possibly also to an elevated formation of memory T cells. The sustained CD30 signaling even lead to a partial exhaustion of CD8<sup>+</sup> T cells in LMP1/CD30//CD4Cre mice which coincided with the expression of exhaustion markers and reduced CD8<sup>+</sup> T cell numbers in the spleen. A constitutive CD30 signaling in CD8<sup>+</sup> T cells, therefore, seems to influence the appearance of exhausted CD8<sup>+</sup> T cells. I was able to show that in contrast to control CD4<sup>+</sup> T cells, no FoxO1 was detectable in CD4<sup>+</sup> T cells of LMP1/CD30//CD4Cre mice. Possibly, the increased activity of the Akt/p38 pathway leads to the degradation of FoxO1. The strongly reduced FoxO1 levels might be responsible for the activated phenotype of CD4<sup>+</sup> T cells and the putatively elevated formation of memory T cells. The generation of T<sub>H</sub>1 cells is promoted by the activity of the Jnk and p38 signaling pathway in CD4<sup>+</sup> T cells. Since these two MAP kinase pathways were strongly activated in LMP1/CD30 expressing CD4<sup>+</sup> T cells, we analyzed whether constitutive CD30 signaling stimulated the formation of T<sub>H</sub>1 cells. This was confirmed in LMP1/CD30-expressing CD4<sup>+</sup> T cells via the partial expression of the T<sub>H</sub>1 marker TIM-3 and an increased secretion of IFN- $\gamma$ , especially after the stimulation of the cells. These data imply that CD30 signals, in combination with an activation of CD4<sup>+</sup> T cells, likely promote the formation of T<sub>H</sub>1 cells. Until now it was not known whether there is a connection between CD30 signaling and the development of follicular T helper cells. I was able to show that constitutive CD30 signaling in CD4<sup>+</sup> T cells inhibits the generation of follicular T helper cells. As a consequence, the formation of germinal centers and the production of antigen-specific antibodies was no longer possible. We suggest that the CD30 signaling-induced, activated state of T cells in LMP1/CD30//CD4Cre mice directly or indirectly affected the B cells. Here, the overall antibody titers in the mice were strongly diminished which might be attributable to the absence of marginal zone B cells and B1 cells. Additionally, the T cell-independent immune response was defective in these mice. In aging LMP1/CD30//CD4Cre mice even a depletion of B cells in the spleen was observed.

In the third part of this thesis, a long-term study was conducted to analyze whether LMP1/CD30//CD4Cre or CD30//CD4Cre mice develop T cell tumors over time. Although aging mice of both transgenic strains showed pathologic abnormalities that prompted the sacrifice of these animals, no signs of tumor development were observed.

## 7 Material

### 7.1 Mausstämme

#### I) LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup> (Petra Fieder, Dissertation 2011)

Mausstamm auf BALB/c Hintergrund in welchem die Transgene *lmp1/cd30* und *humanes CD2* in den *rosa26*-Lokus inseriert wurden. Eine loxP-flankierte STOP-Kassette vor dem *lmp1/cd30*- und dem *hCD2*-Gen verhindert die Expression dieser Transgene. In Anwesenheit einer Cre-Rekombinase wird die STOP-Kassette entfernt und die Expression der Transgene kann unter Kontrolle des *rosa26*-Promotors stattfinden.

#### II) CD30<sup>flSTOP</sup> (Petra Fieder, Dissertation 2011)

Mausstamm auf BALB/c Hintergrund in welchem die Transgene *cd30* und *humanes CD2* in den *rosa26*-Lokus gebracht wurden. Wie bei den LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup> Mäusen verhindert eine loxP-flankierte STOP-Kassette vor dem *cd30*- und *hCD2*-Gen die Expression der Transgene. Die Entfernung der STOP-Kassette erfolgt ebenfalls durch die Cre-Rekombinase. Die Expression der Transgene kann nun unter Kontrolle des starken CAGGs Promotors (CMV *early enhancer/chicken  $\beta$ -actin/ rabbit globulin promotor*) stattfinden.

#### III) CD4Cre (Lee et al., 2001)

Mausstamm auf C57BL/6 Hintergrund in welchem die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD4-Promotors steht. Die Cre-Rekombinase wird bereits im doppelt-positiven Entwicklungsstadium der T-Zellen im Thymus exprimiert, so dass diese, sowohl in den sich daraus entwickelnden reifen CD4<sup>+</sup>, als auch in reifen CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird.

#### IV) CD4CreER<sup>T2</sup> (Sledzinska et al., 2013)

Mausstamm auf C57BL/6 Hintergrund in welchem die Cre-Rekombinase in CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur nach Zugabe von Tamoxifen exprimiert wird. Diese Mäuse wurden nur für *in vitro* Experimente verwendet.

#### V) BALB/c (Charles River Laboratories)

Diese Mäuse wurden für die Erhaltungszuchten der LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup> und der CD30<sup>flSTOP</sup> Mäuse verwendet.

#### VI) C57BL/6 c (Charles River Laboratories)

Diese Mäuse wurden für die Erhaltungszuchten der CD4Cre Mäuse verwendet.

## 7.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für die Genotypisierungs-PCRs wurden von Metabion (Martinsried) bezogen.

**Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide für die Genotypisierung der Mäuse**

Primername	Sequenz 5'-3'
TV CD30 c	CAGTGATCGTGGGCTCTGTA
hCD2 rev	GGAGACTGCACCTTTGGAAG
CD4 for	ACGACCAAGTGACAGCAATG
CD4 rev	CTCGACCAGTTTAGTTACCC
Forward A	TCTTAGTTTGGCAGGACCTT
Rev 1 Tg B	CGGCATCAACGTTTTCTT
Rev 2 wt D	TCTTCTTCTGGGAAGTCT

## 7.3 Antikörper

### I. Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden folgende Antikörper verwendet: Fluorochrom gekoppelte Antikörper spezifisch für B220, CD3, CD4, CD5, CD8, CD21, CD23, CD25, CD44, CD62L, CD69, CD86, CD95, CD138, CXCR5, GL-7, hCD2, IgM, PD-1 (BD Bioscience), CD30, FoxP3, KLRG-1, IFN- $\gamma$ , TIM-3 (eBioscience) und TIM-1 (BioLegend). FoxO1 wurde von Cell Signaling und der dazu verwendete sekundärer Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-PE, von Invitrogen bezogen.

### II. Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

Antigen	Hersteller	Quelle	Gekoppelt an	Verdünnung
Maus CD3	E. Kremmer	Ratte	/	1:2
Maus IgM	Sigma-Aldrich	Ziege	Peroxidase	1:100
Maus MOMA-1	BMA Biomedicals	Ratte	/	1:100
PNA	Vector	Ratte	Biotin	1:2000
Maus GL-7	BD Bioscience	Ratte	PE	1:50
Anti-Ratte IgG2	Jackson Laboratories	Maus	Biotin	1:250
Streptavidin	Sigma-Aldrich	/	Alkaline Phosphatase	1:400
Anti-Ratte	Jackson Laboratories	Ziege	Alexa Fluor 488	1:100



### III. Primäre Antikörper für die Western-Bot-Analysen

Tabelle 3: Verwendete Erstantikörper für die Western-Blot-Analysen

Antigen	Hersteller	Quelle	Verdünnung	Verdünnungslösung
CD30	#sc 46683 Santa Cruz	Maus	1:100	TBST, 5 % (w/v) Milch
CD30	#sc 28806 Santa Cruz	Kaninchen	1:200	TBST, 5 % (w/v) Milch
pAkt (Ser473)	#4056 Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
pJnk	#4668 Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
pp38	#4511 Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
pErk	#9101 Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
Akt	#9272 Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
Jnk	#9258 Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
p38	#9212 Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
Erk	#9102 Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
GAPDH	#CB1001 Calbiochem	Maus	1:10000	TBST, 5 % (w/v) BSA
Tubulin	#2148 Cell Signaling	Maus	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA
FoxO1	#2880 Cell Signaling	Kaninchen	1:1000	TBST, 5 % (w/v) BSA

### IV. Sekundäre Antikörper für die Western-Blot-Analysen

Tabelle 4: Zweitantikörper für die Western-Blot-Analysen

Antigen	Hersteller	Quelle	Verdünnung	Verdünnungslösung (4ml)
$\alpha$ -Kaninchen-IgG	Cell Signaling	Ziege	1:2000	TBST, 5 % (w/v) Milch
$\alpha$ -Maus IgG	Cell Signaling	Pferd	1:2000	TBST, 5 % (w/v) Milch

Alle verwendeten Zweitantikörper waren an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt.

### IV. Antikörper für ELISA

- IgM, II/41; IgG1, A85-3; IgG2a, R11-8; IgG2b, R9-91; IgG3, R2-38; IgA, C11-3; (Fa. BD Bioscience)
- Für NP-spezifische ELISAs: NP17-BSA (Fa. Biosearch Technologies)
- Biotinylierte sekundäre Antikörper: IgM-Bio, R6-60.2; IgG1-Bio, A85-1; IgG2a-Bio, R19-15; IgG2b-Bio, R12-3; IgG3-Bio, R40-82; IgA-Bio, C10-1; (Fa. BD Bioscience)
- Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase (Fa. Vector)

## 7.4 Software

Adobe Illustrator CS2, Adobe Photoshop CS2, GraphPad Prism 4, FlowJo, ImageJ, Axio Vision Zeiss, Epson Scanner program, Microsoft Excel, Microsoft Word, Endnote X

## 7.5 Geräte

Lichtmikroskop (Axioskop, mit einer AxioCam Mrc Kamera, Zeiss), Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M, mit einer AxioCam MRm, Zeiss), Brutschrank (Binder), Cryostat CM1900 UV (Leica), Elektrophoresekammer (Biometra, BioRad), ELISA-Reader (Tecan-Sunrise), FACS Calibur (Becton-Dickinson), Falcon Roller (Coulter Electronics Limited), Gefrierschrank -80°C (Colora), Gefrierschrank -20°C (Liebherr), Kühlschranks (Liebherr), Millipore-Anlage (Millipore), Netzgerät (BioRad), Neubauer-Zählkammer (GLW), PCR-Thermozykler (Biometra), pH-Messgerät (Knick), Pipetten (Eppendorf), Pipettierhilfe (Integra), Spektrophotometer (Eppendorf), Sterilbank (Bio Flow Technik), UV-Transilluminator (UVP-Inc.), Vortexer Genie (Bender & Hobein), Western-Blot-Apparatur (BioRad), Zentrifugen (Eppendorf, Sorvall, Beckman, Hettich)

## 8 Methoden

### 8.1 Analyse von transgenen Mäusen

#### 8.1.1 Maus-Verpaarungen

LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup>- und CD30<sup>flSTOP</sup>-Mäuse (beide BALB/c Hintergrund) wurden mit CD4Cre-Mäusen (C57BL/6 Hintergrund) (Lee et al., 2001) verpaart, um LMP1/CD30//CD4Cre- bzw. CD30//CD4Cre-Mäuse zu erhalten. Die Nachkommen dieser Verpaarungen (F1-Generation) wurden für die Analysen verwendet. CD4Cre-Mäuse dienten als Kontrollmäuse.

Für die in vitro Analysen der LMP1/CD30//CD4CreER<sup>T2</sup>-Mäuse wurden LMP1/CD30<sup>flSTOP</sup>- (C57BL/6 Hintergrund) mit CD4CreER<sup>T2</sup>-Mäusen (ebenfalls C57BL/6 Hintergrund) verpaart. Als Kontrollmäuse dienten CD4CreER<sup>T2</sup>-Mäuse.

Alle Mäuse wurden in offener Käfighaltung gezüchtet und gehalten. Alle Experimente wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt und vorab durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

### 8.1.2 Präparation primärer Lymphozyten aus der Maus

Zur Analyse wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und sofort danach die benötigten Organe entnommen. Um Zellen aus der Bauchhöhle zu bekommen, wurde mit einer Kanüle vorsichtig 7 ml Medium (RPMI 1640, 1 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS (PAA Laboratories), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 50 µM β-Mercaptoethanol, 1 x nichtessenzielle Aminosäuren, alles von Gibco) in den Bauchraum gespritzt und nach Lösen der Zellen durch vorsichtiges Schütteln der Maus wieder entnommen. Blut wurde mittels einer Pasteur-Pipette direkt aus dem Herzen entnommen und bis zu Gewinnung des Serums auf Eis inkubiert. Die Peyerschen Plaques wurden mit einer Schere vorsichtig vom Darm abgeschnitten. Milz, Lymphknoten und Thymus wurden als Ganzes entnommen und ebenso wie die Peyerschen Plaques durch ein feines Sieb (70 µm, Beckton Dickinson) gedrückt, um die Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Bei blutreichem Gewebe wie Milz und Lymphknoten wurde anschließend eine Erythrozyten-Lyse vorgenommen. Hierzu wurden die Zellsuspensionen für 10 Minuten bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen) und das Pellet in 1 ml Lyse-Puffer (1x RBC Lysis Buffer, eBioscience) aufgenommen. Nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 9 ml Medium gestoppt, erneut zentrifugiert und das erhaltene Pellet anschließend in 1 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden, falls nicht anders angegeben, während der gesamten Analyse auf Eis gehalten.

### 8.1.3 Bestimmung der Zellzahlen

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte mithilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axio Vert.A1 mit Phasenkontrast). Hierfür wurden von den Zellsuspensionen der verschiedenen Organe 10 µl entnommen und 1:100 oder 1:10 Verdünnungen mit Medium hergestellt. 10 µl davon wurden in die Neubauer-Kammer pipettiert und zwei bis vier Groß-Quadrate ausgezählt. Es wurden nur große, helle Zellen gezählt. Die Zellzahlen pro ml wurden wie folgt bestimmt: Mittelwert der gezählten Zellen x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup> (Zählkammerfaktor). Falls Zellen mithilfe von Trypanblau (Gibco) gezählt wurden, wurden die Zellsuspension mit Trypanblau 1:2 verdünnt und nur die nicht-gefärbten, lebenden Zellen gezählt.

### 8.1.4 Isolierung reifer T- und B-Zellen aus der Milz

Die Trennung von T- bzw. B-Zellen von den restlichen Milzzellen erfolgte durch magnetische Separation (Magnetic Cell Separation, Miltenyi Biotec).

Die Isolierung der T-Zellen erfolgte mit Hilfe des „Mouse Pan T Cell Isolation Kit II“ (Miltenyi Biotec) nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden  $10^7$  Milzzellen in 40  $\mu$ l MACS-Puffer (Miltenyi Biotec) resuspendiert und 10  $\mu$ l des mitgelieferten Antikörpercocktails zugegeben. Die Antikörper des Antikörpercocktails sind Biotin-gekoppelt und binden nur an „nicht-T-Zellen“. Nach 10-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden 30  $\mu$ l MACS-Puffer und 20  $\mu$ l  $\alpha$ -Biotin-MicroBeads zugegeben und der Ansatz für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 10 ml MACS-Puffer wurden die Zellen in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen und anschließend im Magnetfeld über Separationssäulen gegeben. Da die magnetischen MicroBeads nur an „nicht-T-Zellen“ binden, konnten die T-Zellen die Separationssäulen passieren. Bevor die T-Zellen für Experimente eingesetzt wurden, erfolgte ein Waschschrift mit 10 ml MACS-Puffer. Wurden mehr als  $10^7$  Milzzellen eingesetzt, wurden die verwendeten Volumina der benötigten Reagenzien entsprechend skaliert.

Die Isolierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde in gleicher Weise durchgeführt, hierzu wurde jedoch das „Mouse CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec) verwendet. Die Reinheit der isolierten T-Zellen bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen lag bei 85-95 %.

Die Isolierung der B-Zellen aus der Milz erfolgte unter Verwendung der „Mouse CD43 (Ly-48) MicroBeads“ (Miltenyi) nach dem gleichen Prinzip. Milzzellen wurden mit CD43-Antikörpern, die an magnetische Beads gekoppelt waren, inkubiert und über Separationssäulen gegeben. Die CD43-negativen B-Zellen passierten die Separationssäulen. Die Reinheit der isolierten B-Zellen lag bei 95-98 %.

### 8.1.5 Immunisierung von Mäusen

#### 8.1.5.1 T-Zell-abhängige Immunisierung der Mäuse

Um eine T-Zell-abhängige Immunantwort zu erhalten, wurden Mäuse mit 100  $\mu$ g NP-Hühner-Gammaglobulin (CGG, *NP-chicken-gamma-globulin*, ein 4-Hydroxy-3-nitro-phenylacetyl Hapten, Biosearch Technologies) immunisiert. Zur Verbesserung der Immunreaktion wurde NP-CGG mit Kaliumaluminiumsulfat vor der Immunisierung gefällt. Für die Präzipitation wurde ein Volumen des Antigens mit einem Volumen KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Lösung (10 %) gemischt und mit 1 M NaOH auf pH 6,5 eingestellt. Das Antigen wurde auf Eis für 30 Minuten

inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 1600 x g (4200 rpm, Minifuge Sigma) zentrifugiert und dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Für die Immunisierung wurde das Antigen in 200 µl sterilen PBS resuspendiert und den Mäusen intraperitoneal gespritzt. Die Mäuse wurden 14 Tage nach Immunisierung getötet und analysiert.

#### **8.1.5.2 T-Zell-unabhängige Immunisierung der Mäuse**

Für die Auslösung einer T-Zell-unabhängigen Immunantwort wurden Mäuse mit 50 µg NP-Ficoll (Biosearch Technologies) immunisiert. Das Antigen wurde in 200 µl PBS resuspendiert und den Mäusen intraperitoneal injiziert. Die Analyse der Mäuse erfolgte 14 Tage nach Immunisierung.

#### **8.1.6 Präparation vom Blutserum aus Mäuseblut**

Zur Gewinnung der Seren wurde den getöteten Mäusen Blut aus dem Herzen entnommen. Wurde Serum von immunisierten Mäusen benötigt, wurde den Mäusen 50 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Das Blut wurde für mindestens 3 Stunden zum Gerinnen auf Eis inkubiert und anschließend bei 15.000 x g (Eppendorf-Tischzentrifuge, 5417R) und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abgenommen, und der Zentrifugationsschritt zweimal wiederholt, um ein möglichst reines Serum zu erhalten. Das so gewonnene Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **8.1.7 Durchflusszytometrie**

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem FACS Calibur™ (BD Biosciences) Gerät durchgeführt und die Ergebnisse mit der Software FlowJo ausgewertet.

##### **8.1.7.1 Analyse von Oberflächenproteinen mittels Durchflusszytometer**

Um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen mit MACS-Puffer (PBS/1 % (w/v) BSA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit FITC-, PE-, PerCP- oder APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern (verdünnt in MACS-Puffer) für 30 Minuten auf Eis gefärbt und danach einmal mit MACS-Puffer gewaschen. Es wurden  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen pro Färbung eingesetzt. Enthielt ein Färbemix den gegen CXCR5 gerichteten Antikörper, wurden die Zellen für 60 Minuten gefärbt. Falls für die Analyse nötig,

wurden die Zellen zusätzlich mit TOPRO-3 (Endverdünnung von 1:40.000, Molecular Probes) versetzt, um tote Zellen anzufärben.

#### **8.1.7.2 Analyse von intrazellulären Proteinen mittels Durchflusszytometer**

Nach Färbung der Oberflächenmarker (vorheriger Abschnitt) und Waschen der Zellen mit MACS-Puffer wurden diese in 200 µl Histofix (PBS/4 % PFA, Carl Roth) aufgenommen und so für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nachdem zweimaligem Waschen der Zellen mit Permeabilisierungspuffer (PBS mit 1 % (w/v) BSA (Applichem) und 0,5 % (w/v) Saponin (VWR), wurden die Zellen durch Zugabe des Antikörpers (in dieser Arbeit: FoxO1, FoxP3 oder IFN- $\gamma$ ) für 30 min gefärbt. Der Antikörper wurde ebenfalls im Permeabilisierungspuffer verdünnt. Saponin permeabilisiert die Zellmembranen, so dass eine Anfärbung von intrazellulären Proteinen möglich ist. Bevor die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden konnten, wurden diese noch zweimal mit PBS gewaschen.

#### **8.1.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Mit Hilfe eines ELISAs kann die Serumkonzentration von sezernierten Antikörpern einer bestimmten Spezifität oder von bestimmten Immunglobulin Isotypen, aber auch von im Serum gelöster Proteine bestimmt werden. Alle ELISAs erfolgten mit Seren, die auf -80 °C gelagert worden waren und vor der Durchführung auf Eis aufgetaut wurden.

##### **8.1.8.1 Bestimmung der allgemeinen Immunglobulintiter im Serum**

Maxisorb 96-Loch Platten (Nunc) wurden über Nacht bei 4 °C mit 5 µg/ml der Ig-Isotyp-spezifischen Ratte-anti-Maus Antikörper (je nach Isotyp, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, alle von BD Bioscience) in 0,1 N NaHCO<sub>3</sub> Puffer (pH 9,2) beschichtet. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Platten wurden am nächsten Tag dreimal mit PBS gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen mit Blockingpuffer (1% Milchpulver in Phosphat-gepufferter Salzlösung) durch 30-minütige Inkubation abgesättigt. Die Seren wurden mit Blockingpuffer verdünnt und auf die Platten gegeben. Zusätzlich wurde auf jeder Platte ein Ig-spezifischer Standard mit bekannter Konzentration aufgetragen. Nach einer Stunde erfolgte ein dreimaliges Waschen der Platten, und anschließend die Zugabe des, je nach Isotyp, biotinylierten sekundären Antikörpers (IgM-Bio, IgG1-Bio, IgG2a-Bio, IgG2b-Bio, IgG3-Bio, IgA-Bio). Nach einer 60-minütigen

Inkubationszeit des sekundären Antikörpers wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase (1:2000 Verdünnung in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,2) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten, erfolgte wiederum ein dreimaliges Waschen der Platten mit PBS. Die Detektion der gebundenen Phosphatase erfolgte durch Zugabe von O-Phenyldimine in 0,1 M Zitronensäure-Puffer mit 0,015 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches als Substrat für die Reaktion fungiert. Die Farbreaktion wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesers (Photometer Sunrise RC) bei 405 nm gemessen.

#### **8.1.8.2 Bestimmung von NP-spezifischen Immunoglobulintiter im Serum**

Zum Nachweis NP-spezifischer Antikörper wurden 96-Lochplatten (Nunc) mit 5 µg/ml NP<sub>17</sub>-BSA beschichtet. Die weitere Durchführung des ELISAs erfolgte nach dem Protokoll zum Nachweis der allgemeinen Immunoglobulintiter im Serum. Abweichend davon erfolgte die Bestimmung der Antikörperkonzentrationen nicht mit Hilfe eines definierten Standards. Die Quantifizierung der Menge von NP-spezifischen Antikörpern im Serum erfolgte durch Standardisierung auf ein Serum einer immunisierten Kontrollmaus, so dass hier keine Konzentrationen, sondern nur relative Einheiten ermittelt werden konnten. Der Nachweis von NP<sub>17</sub>-spezifischen Antikörpern ermöglicht die Detektion von hoch- und nieder-affinen NP-spezifischen Antikörpern.

#### **8.1.8.3 Bestimmung von löslichem CD30 im Serum**

Die Bestimmung von löslichem CD30 im Serum wurde mit Hilfe des CD30 Maus ELISA Kit (Abcam) durchgeführt. Hierzu wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß 50 µl Serum und 450 µl Diluent A pipettiert, um eine 1:10 Verdünnung des Serums herzustellen. Von dieser Verdünnung wurde unter Verwendung des Diluent A eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 3 hergestellt (Verdünnungen: 1:30, 1:90, 1:270, 1:870, 1:2430, 1:7290 und 1:21870). Von dem mitgelieferten CD30 Standard (50 ng/ml) wurden 30 µl zu 470 µl Diluent A pipettiert um so eine Standardkonzentration von 3000 pg/ml zu erhalten. Die weitere Verdünnung des CD30 Standards und Durchführung des CD30 ELISAs erfolgte nach Angaben des Herstellers.

## 8.2 Zellkultur

Die Durchführung der Zellkulturarbeiten erfolgte mit sterilen Pipetten und Lösungen unter einer Umluft-Sterilbank. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei 300 x g (1200 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge, 5417R) für 10 Minuten zentrifugiert. Für die Waschschrte wurde steriles PBS (Dulbecco, PAA Laboratories) verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (Binder) bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Dem verwendeten Zellkulturmedium (RPMI 1640, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 50 µM β-Mercaptoethanol, 1 x nichtessenzielle Aminosäuren) wurden je nach Experiment unterschiedliche Stimuli oder Reagenzien zugegeben.

### 8.2.1 Kultivierung von murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Von aus der Milz isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden 3x10<sup>5</sup> – 5x10<sup>5</sup> Zellen/100 µl für die in vitro Experimente in 96-Loch Platten (Nunc) kultiviert.

#### 8.2.1.1 Analyse der CD30-Expression

Die Analyse der CD30-Expression erfolgte durch Stimulierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dem T-Zell Aktivierungs/Expansions Kit (Miltenyi Biotec) nach Angaben des Herstellers. Zur Aktivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden MACSiBeads<sup>TM</sup>, welche mit α-CD3- und α-CD28-Antikörpern gekoppelt waren, verwendet. Für die Aktivierung von in 100 µl Medium resuspendierten 5x10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden 5 µl MACSiBeads<sup>TM</sup> benötigt. Hierfür wurden 5 µl MACSiBeads<sup>TM</sup> mit 1 ml Medium gewaschen, anschließend in 100 µl Medium resuspendiert und zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen gegeben. Wurden weniger CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Stimulation eingesetzt, wurde die Menge der verwendeten MACSiBeads<sup>TM</sup> entsprechend skaliert. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden drei Tage lang kultiviert und täglich mit Hilfe des Durchflusszytometers die Expression von CD30 gemessen.

#### 8.2.1.2 Kultivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Induktion von LMP1/CD30

Für die Induktion des LMP1/CD30 Transgens wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen von LMP1/CD30//CD4CreER<sup>T2</sup>-Mäusen und CD4CreER<sup>T2</sup>-Kontrollmäusen ebenfalls unter



Verwendung des T-Zell Aktivierungs/Expansions Kits (Durchführung wie oben beschrieben) stimuliert. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von Tamoxifen (1  $\mu$ M Endkonzentration, Sigma-Aldrich) ins Medium. Nach viertägiger Kultivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte die Analyse der Zellen mittels durchflusszytometrischer Messung. Parallel wurden jeweils Zellen ohne Stimulus und ohne Tamoxifen in Kultur genommen.

### 8.2.2 Stimulation der T-Zellen mit PMA und Ionomycin zur IFN- $\gamma$ Produktion

Zur Induktion der IFN- $\gamma$  Produktion von T-Zellen wurden  $4 \times 10^7$  Milzzellen in 100  $\mu$ l resuspendiert und in jeweils 1 Loch einer 24-Loch Platte (Falcon) pipettiert. Zu 100  $\mu$ l Zellen wurden jeweils 900  $\mu$ l Stimulierungsmedium (Zellkulturmedium mit PMA (*Phorbol myristat acetat*; 1:50.000 Verdünnung von 1 mM Stock, Calbiochem) und Ionomycin (1:10.000 Verdünnung von 10 mM Stock, Calbiochem) gegeben. Die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin führt zu einer starken, unspezifischen Aktivierung der T-Zellen. Nach einer 4-stündigen Inkubation der Zellen bei 37 °C im Brutschrank wurden 100  $\mu$ l Brefeldin A (1:500 Verdünnung von 5 mg/ml Stock, Sigma-Aldrich) zugegeben und die Zellen für weitere zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe von Brefeldin A verhindert die Sekretion der produzierten Zytokine ins Medium. Abschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und das gebildete IFN- $\gamma$  durchflusszytometrisch detektiert.

### 8.2.3 Kurzzeitstimulation der T-Zellen mit PMA und Ionomycin

$5 \times 10^5$  aus der Milz isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in 100  $\mu$ l Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde zu den Zellen je 100  $\mu$ l Zellkulturmedium mit PMA (1:50.000 Verdünnung von 1 mM Stock) und Ionomycin (1:10.000 Verdünnung von 10 mM Stock) gegeben. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 5, 10, 15 und 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank. Die Stimulation der Zellen wurde durch Zugabe von eiskaltem PBS-Puffer gestoppt. Nach Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS-Puffer wurde aus den Zellen Protein isoliert. Die Proteinextrakte wurden verwendet um Signalwege mittels Western Blot Analysen untersuchen zu können.

### 8.2.4 Kultivierung von murinen B-Zellen

Zur Langzeitstimulation von aus der Milz isolierten B-Zellen wurden  $5 \times 10^5$  B-Zellen in 200  $\mu$ l in je ein Loch einer 96-Loch Platte pipettiert.

Um die Plasmazelldifferenzierung der B-Zellen auszulösen, wurde dem Medium LPS (Lipopolysaccharid, 50  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich) zugegeben und die Zellen über drei Tage kultiviert.

Die Untersuchung des Aktivierungspotentials der B-Zellen erfolgte durch Zugabe von  $\alpha$ -IgM (15  $\mu$ g/ml; AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> goat  $\alpha$ -mouse IgM,  $\mu$ -chain, Dianova) und  $\alpha$ -CD40 (2,5  $\mu$ g/ml; (HM40-3), eBioscience) in das Medium und zweitägiger Kultivierung der B-Zellen. Parallel wurden jeweils B-Zellen ohne Stimulus kultiviert.

## 8.3 Immunhistochemie und Immunofluoreszenz

Die Milzen wurden nach Präparation in Tissue Tec (Sakura) eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert. Mit einem Kryotom (Leica Microsystems) wurden 5-8  $\mu$ m dicke Milzschnitte angefertigt, welche über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 10 Minuten im 100 % Aceton (v/v) fixiert und erneut für 20 min getrocknet. Nach Rehydrierung durch Inkubation für 5 min in PBS wurden die Schnitte mit einem Blocking Kit (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories) nach Angaben des Herstellers behandelt um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Die Inkubation der benötigten Antikörper erfolgte für jeweils 60 Minuten. Zwischen den Inkubationzeiten wurden die Schnitte jeweils dreimal mit PBS gewaschen.

Streptavidin-gekoppelte Antikörper wurden mit Hilfe des Alkalische Phosphatase Substrat-Kit III (Vector Laboratories) in Blau und Peroxidase-gekoppelte Antikörper durch eine Reaktion mit 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories) in Rot angefärbt. Die Farbreaktionen wurden mit PBS abgestoppt, die gefärbten Präparate getrocknet und mit Gelatine (Kaisers Gelatine, Merck) eingebettet.

Die Einbettung der Schnitte, welche mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt wurden, erfolgte mit ProLong Gold (Life Technologies).

Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop oder unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

## 8.4 Molekularbiologische Methoden

### 8.4.1 DNA-assozierte Techniken

#### 8.4.1.1 DNA Isolation aus Mausschwanzspitzen

Die Isolierung von DNA aus Mausschwanzspitzen erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Laird (Laird et al., 1991). Ein etwa 2 mm langes Stück des Mausschwanzes wurde über Nacht unter Schütteln in 500 µl Lysepuffer (Tris/HCl pH 8, (100 mM); EDTA (5 mM); SDS (0,2 %); NaCl (200 mM); 100µg/ml Proteinase K (Sigma-Aldrich) bei 56 °C inkubiert. Zur Proteinfällung wurde am nächsten Tag 170 µl einer gesättigten NaCl-Lösung zugegeben und nach kurzem Schütteln des Reaktionsgefäßes, für 10 min bei 15.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, welches mit 600 µl 100 %-igen Isopropanol versetzt war. Nach mehrmaligem Invertieren wurde der Ansatz bei 15.000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %-igen Ethanol gewaschen und bei 15.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die DNA wurde nach Trocknen in einem Heizblock bei 37 °C in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris, pH 7,9; 1 mM EDTA) gelöst.

#### 8.4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985). Für die Reaktion wurde genomische DNA, die wie bereits beschrieben, aus Mäuseschwänzen isoliert worden war, eingesetzt. Magnesium-, sowie DMSO Konzentrationen wurden ebenso, wie das PCR-Programm, dem jeweiligen Primerpaar angepasst. Die Taq-Polymerase wurde von New England Biolabs bezogen.

**Tabelle 5: PCR-Reaktionsansatz**

Reaktionsansatz	
DNA: 5-10 ng	
Primer (100 µM)	0,1-0,5 µL
dNTP-Mix (10 mM))	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1-2 µL
DMSO (100%)	0-1 µl
Taq-Puffer (10 X)	2,5 µL
Taq-Polymerase (5 U/µL)	0,15 µL
Wasser	ad 25 µL

**Tabelle 6: PCR-Programm**

PCR-Programm		
Starttemperatur	95°C	5 min
Zyklische Denaturierung	95°C	45 sec
Zyklische Hybridisierung	56-62°C	45 sec
Zyklische Verlängerung	72°C	0,5-1 min
Finale Verlängerung	72°C	10 min
Zyklenzahl	30-35	

### 8.4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach Sambrook (Sambrook und Russel, 2002) durchgeführt, um PCR-Produkte nach ihrer Größe aufzutrennen und sichtbar zu machen. Zur Herstellung der 1 bis 2 %-igen Agarosegele, wurde entsprechend Agarose in 1 x TAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,5) unter Erhitzen gelöst und 5 µg/ml Ethidiumbromid (Carl Roth) zugegeben. Die Elektrophorese wurde in einer Gelelektrophorese-Kammer (Peqlab) mit 1 x TAE-Puffer bei 100 V für 20-60 Minuten durchgeführt. Als Größenmarker wurde ein 1 kB Marker (Invitrogen) verwendet.

### 8.4.2 Proteindetektion

#### 8.4.2.1 Präparation von Proteinen aus primären Lymphozyten

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $2 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$ ) wurden 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen, pelletiert und in 20 µl 2-fachem NP40-Extraktionspuffer (100 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl, 4 mM EDTA, 2 % (v/v) NP40) resuspendiert. Protease- (Mini Complete Tabletten, Roche Diagnostics) und Phosphatase-Inhibitoren (Halt Phosphatase-Inhibitor Cocktail, Pierce) wurden zugegeben, um die Degradation durch Proteasen und die Dephosphorylierung durch Phosphatasen der Proteine zu minimieren. Zur Lyse der Zellen wurde der Ansatz für 30 Minuten abwechselnd für je 5 Minuten auf Eis inkubiert und ein paar Sekunden auf höchster Stufe mehrmals für ein paar Sekunden gevortext. Um die freigesetzten Proteine von Zelltrümmern und DNA zu trennen, wurde das Lysat bei maximaler Umdrehungszahl für 15 Minuten zentrifugiert (4 °C, Eppendorf-Tischzentrifuge, 5417R) und die im Überstand enthaltenen Proteine bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

#### 8.4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem DC Protein Assay von Bio Rad und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde zu 700 µl Wasser und 200 µl Bio-Rad Reagenz 1 µl Proteinextrakt zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 600 nm gemessen. Parallel dazu wurde zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Proben eine Eichgerade mit bovinem Serumalbumin angefertigt.

#### 8.4.2.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) können Proteine im denaturierten Zustand nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt werden. Die negative Ladung des anionischen Tensids SDS überdeckt die Eigenladung des Proteins, so dass die denaturierten, negativ geladenen Proteine im SDS-Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes durch die Poren des Polyacrylamidgels zur Anode wandern. Durch die vernetzte Struktur des Gels wandern die kleinen Proteine schneller zu Anode. Ein SDS-Gel besteht aus einem großporigen Sammelgel (5 % (v/v) Acrylamid (Carl Roth), 0,625 mM Tris pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS (Applichem), 0,006 % (w/v) TEMED (Carl Roth), in dem die Proteine gleich schnell durch das Gel laufen, so dass die Auftrennung an der Grenze zum Trenngel von allen Proteinen zeitgleich erfolgt. Im Trenngel (10 to 12 % (v/v) Acrylamid, 3,75 mM Tris pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,004 % (w/v) TEMED) werden die Proteine nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Die Elektrophoresekammern des Bio-Rad Systems (Bio-Rad, Hercules) wurden nach Herstellerangaben verwendet und mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-Base, 0,2 M Glycin, 0,1 % (v/v) SDS) gefüllt. Vor dem Denaturieren der Proteine bei 70 °C für 10 Minuten wurden 10-20 µg des Proteinextrakts mit 5 x Laemmli-puffer (300 mM Tris pH 6,8, 7,5 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (v/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt. Ein Proteinstandard (Prestained Protein Ladder, Fermentas) wurde als Größenmarker mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 V (konstant) für das Sammelgel und 100 V (konstant) für das Trenngel.

#### 8.4.2.4 Western Blotting

Um bestimmte Proteine mit Antikörpern detektieren zu können, wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels des Nassblot-Verfahrens (Towbin et al., 1979) im elektrischen Feld bei 50 mA in einer Bio-Rad Blotting Apparatur in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 0,2 M Glycin, 20 % (v/v) Methanol) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Immobilon™ P membrane, Millipore) übertragen. Dieser Vorgang fand über Nacht im Kühlraum bei 4 °C statt, um die Proteine vor einer Zerstörung durch Hitze zu schützen.

#### 8.4.2.5 Immundetektion

Die zu detektierenden Proteine können mittels spezifischer Antikörper auf der Western Blot Membran sichtbar gemacht werden. Der Proteinnachweis erfolgt mit Hilfe zweier Antikörper. Der Erstantikörper bindet spezifisch an das gesuchte Protein, der Zweitantikörper bindet spezifisch an den Erstantikörper. Der Zweitantikörper ist an das Enzym Meerrettich-(horseradish)-Peroxidase (HRP) gekoppelt, welches die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol katalysiert. Das oxidierte Luminol emittiert Licht, so dass durch Auflegen eines lichtsensitiven Films (CEA RP new) auf die Membran der Film an der Position des detektierten Proteins belichtet wird. Nach Entwicklung des Films mit Hilfe eines Cawomat 2000 IR processor (Ernst Christiansen) zeigten sich Proteinbanden als schwarze Banden auf dem Film. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden die Western-Blot Membranen zunächst in TBST (0,1 M Tris/HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,02 % (v/v) Tween) mit 5 % Rinderserumalbumin (BSA) für 1-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper (in TBST mit 5% BSA verdünnt) erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Roller. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (in einer 5 % Milchpulver-TBST-Lösung (w/v) verdünnt) erfolgte nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST, um eventuell unspezifische Bindungen des Erstantikörpers zu lösen. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran mit Reagenzien des ECL-Kits (Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers behandelt.

#### 8.4.2.6 Quantifizierung der Western Blots

Die entwickelten Filme wurden an einem Epson Expression-1680 Scanner unter identischen Einstellungen eingescannt. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ, nach Anleitung der Tutorials auf der Webseite [www.lukemiller.org](http://www.lukemiller.org). Die Standardisierung erfolgte auf die Ladekontrollen GAPDH oder Tubulin.

### 8.5 Statistik

Signifikanzen (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  \*\*\*\* $P < 0,0001$ ) wurde mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests (two-tailed student's t-test) unter Verwendung der Software GraphPad Prism 4, berechnet.

## 9 Literaturverzeichnis

- Agrawal, A., Dillon, S., Denning, T.L., and Pulendran, B. (2006) ERK1-/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 176(10), 5788-5796.
- Aizawa, S., Nakano, H., Ishida, T., Horie, R., Nagai, M., Ito, K., Yagita, H., Okumura, K., Inoue, J., and Watanabe, T. (1997) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation. *J Biol Chem*, 272(4), 2042-2045.
- Allen, C.D., and Cyster, J.G. (2008) Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol*, 20(1), 14-25.
- Amedei, A., Pimpinelli, N., Grassi, A., Bella, C.D., Niccolai, E., Brancati, S., Benagiano, M., D'Elis, S., Bosi, A., and D'Elis, M.M. (2013) Skin CD30(+) T cells and circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with graft versus host disease. *Auto Immun Highlights*, 5(1), 21-26.
- Amour, A., Knight, C.G., Webster, A., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Knauper, V., Docherty, A.J., and Murphy, G. (2000) The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Lett*, 473(3), 275-279.
- Anderson, M.S., and Su, M.A. (2011) Aire and T cell development. *Curr Opin Immunol*, 23(2), 198-206.
- Angelosanto, J.M., and Wherry, E.J. (2010) Transcription factor regulation of CD8+ T-cell memory and exhaustion. *Immunol Rev*, 236, 167-175.
- Ansell, S.M., Horwitz, S.M., Engert, A., Khan, K.D., Lin, T., Strair, R., Keler, T., Graziano, R., Blanset, D., Yellin, M., Fischkoff, S., Assad, A., and Borchmann, P. (2007) Phase I/II study of an anti-CD30 monoclonal antibody (MDX-060) in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 25(19), 2764-2769.
- Arpin, C., Dechanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1995) Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science*, 268(5211), 720-722.
- Asada, S., Daitoku, H., Matsuzaki, H., Saito, T., Sudo, T., Mukai, H., Iwashita, S., Kako, K., Kishi, T., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. (2007) Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal*, 19(3), 519-527.
- Aziz, M., Holodick, N.E., Rothstein, T.L., and Wang, P. (2015) The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol Res*, 63(1-3), 153-166.
- Baaten, B.J., Li, C.R., and Bradley, L.M. (2010) Multifaceted regulation of T cells by CD44. *Commun Integr Biol*, 3(6), 508-512.
- Baaten, B.J., Tinoco, R., Chen, A.T., and Bradley, L.M. (2012) Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44. *Front Immunol*, 3(23), 23.
- Baker, C., Chang, L., Elsegood, K.A., Bishop, A.J., Gannon, D.H., Narendran, P., Leech, N.J., and Dayan, C.M. (2007) Activated T cell subsets in human type 1 diabetes: evidence for expansion of the DR+ CD30+ subpopulation in new-onset disease. *Clin Exp Immunol*, 147(3), 472-482.
- Barbieri, A., Dolcino, M., Tinazzi, E., Rigo, A., Argentino, G., Patuzzo, G., Ottria, A., Beri, R., Puccetti, A., and Lunardi, C. (2015) Characterization of CD30/CD30L(+) Cells in Peripheral Blood and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res*, 2015(729654), 729654.
- Barry, M., and Bleackley, R.C. (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*, 2(6), 401-409.
- Baumgarth, N. (2011) The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*, 11(1), 34-46.

- Baumler, C.B., Bohler, T., Herr, I., Benner, A., Krammer, P.H., and Debatin, K.M. (1996) Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children. *Blood*, 88(5), 1741-1746.
- Boddicker, R.L., Kip, N.S., Xing, X., Zeng, Y., Yang, Z.Z., Lee, J.H., Almada, L.L., Elswa, S.F., Knudson, R.A., Law, M.E., Ketterling, R.P., Cunningham, J.M., Wu, Y., Maurer, M.J., O'Byrne, M.M., Cerhan, J.R., Slager, S.L., Link, B.K., Porcher, J.C., Grote, D.M., Jelinek, D.F., Dogan, A., Ansell, S.M., Fernandez-Zapico, M.E., and Feldman, A.L. (2015) The oncogenic transcription factor IRF4 is regulated by a novel CD30/NF-kappaB positive feedback loop in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*, 125(20), 3118-3127.
- Bossaller, L., Burger, J., Draeger, R., Grimbacher, B., Knoth, R., Plebani, A., Durandy, A., Baumann, U., Schlesier, M., Welcher, A.A., Peter, H.H., and Warnatz, K. (2006) ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol*, 177(7), 4927-4932.
- Boucher, L.M., Marengere, L.E., Lu, Y., Thukral, S., and Mak, T.W. (1997) Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*, 233(3), 592-600.
- Bourgeois, C., and Tanchot, C. (2003) Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *Eur J Immunol*, 33(12), 3225-3231.
- Bowen, M.A., Lee, R.K., Miragliotta, G., Nam, S.Y., and Podack, E.R. (1996) Structure and expression of murine CD30 and its role in cytokine production. *J Immunol*, 156(2), 442-449.
- Brooks, D.G., Teyton, L., Oldstone, M.B., and McGavern, D.B. (2005) Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J Virol*, 79(16), 10514-10527.
- Buchan, S.L., and Al-Shamkhani, A. (2012) Distinct motifs in the intracellular domain of human CD30 differentially activate canonical and alternative transcription factor NF-kappaB signaling. *PLoS ONE*, 7(9), e45244.
- Buechel, H.M., Stradner, M.H., and D'Cruz, L.M. (2015) Stages versus subsets: Invariant Natural Killer T cell lineage differentiation. *Cytokine*, 72(2), 204-209.
- Cabrera, C.M., Urra, J.M., Carreno, A., and Zamorano, J. (2013) Differential expression of CD30 on CD3 T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*, 78(3), 306-312.
- Caza, T., and Landas, S. (2015) Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *Biomed Res Int*, 2015(521957), 521957.
- Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013) Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, 13(2), 118-132.
- Chakrabarty, S., Nagata, M., Yasuda, H., Wen, L., Nakayama, M., Chowdhury, S.A., Yamada, K., Jin, Z., Kotani, R., Moriyama, H., Shimozato, O., Yagita, H., and Yokono, K. (2003) Critical roles of CD30/CD30L interactions in murine autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol*, 133(3), 318-325.
- Chiarle, R., Podda, A., Prolla, G., Podack, E.R., Thorbecke, G.J., and Inghirami, G. (1999) CD30 overexpression enhances negative selection in the thymus and mediates programmed cell death via a Bcl-2-sensitive pathway. *J Immunol*, 163(1), 194-205.
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011) ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*, 34(6), 932-946.
- Clambey, E.T., Davenport, B., Kappler, J.W., Marrack, P., and Homann, D. (2014) Molecules in medicine mini review: the alphabeta T cell receptor. *J Mol Med (Berl)*, 92(7), 735-741.



- Crespo, J., Sun, H., Welling, T.H., Tian, Z., and Zou, W. (2013) T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*, 25(2), 214-221.
- Crotty, S. (2014) T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*, 41(4), 529-542.
- Curtiss, M.L., Gorman, J.V., Businga, T.R., Traver, G., Singh, M., Meyerholz, D.K., Kline, J.N., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Colgan, J.D., Rothman, P.B., and Cassel, S.L. (2012) Tim-1 regulates Th2 responses in an airway hypersensitivity model. *Eur J Immunol*, 42(3), 651-661.
- Daniels, M.A., and Teixeira, E. (2015) TCR Signaling in T Cell Memory. *Front Immunol*, 6(617), 617.
- de Leval, L., and Gaulard, P. (2010) CD30+ lymphoproliferative disorders. *Haematologica*, 95(10), 1627-1630.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015) Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*, 15(3), 137-148.
- Del Prete, G., De Carli, M., D'Elia, M.M., Daniel, K.C., Almerigogna, F., Alderson, M., Smith, C.A., Thomas, E., and Romagnani, S. (1995) CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. *J Exp Med*, 182(6), 1655-1661.
- Demberg, T., Mohanram, V., Musich, T., Brocca-Cofano, E., McKinnon, K.M., Venzon, D., and Robert-Guroff, M. (2015) Loss of marginal zone B-cells in SHIVSF162P4 challenged rhesus macaques despite control of viremia to low or undetectable levels in chronic infection. *Virology*, 484, 323-333.
- den Haan, J.M., Mebius, R.E., and Kraal, G. (2012) Stromal cells of the mouse spleen. *Front Immunol*, 3(201), 201.
- Duan, J.X., Rapti, M., Tsigkou, A., and Lee, M.H. (2015) Expanding the Activity of Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP)-1 against Surface-Anchored Metalloproteinases by the Replacement of Its C-Terminal Domain: Implications for Anti-Cancer Effects. *PLoS ONE*, 10(8), e0136384.
- Duckett, C.S., Gedrich, R.W., Gilfillan, M.C., and Thompson, C.B. (1997) Induction of nuclear factor kappaB by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol Cell Biol*, 17(3), 1535-1542.
- Dürkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B., and Stein, H. (1992) Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell*, 68(3), 421-427.
- Egawa, T. (2015) Regulation of CD4 and CD8 coreceptor expression and CD4 versus CD8 lineage decisions. *Adv Immunol*, 125, 1-40.
- Eichenauer, D.A., Simhadri, V.L., von Strandmann, E.P., Ludwig, A., Matthews, V., Reiners, K.S., von Tresckow, B., Saftig, P., Rose-John, S., Engert, A., and Hansen, H.P. (2007) ADAM10 inhibition of human CD30 shedding increases specificity of targeted immunotherapy in vitro. *Cancer Res*, 67(1), 332-338.
- El-Far, M., Halwani, R., Said, E., Trautmann, L., Doroudchi, M., Janbazian, L., Fonseca, S., van Grevenynghe, J., Yassine-Diab, B., Sekaly, R.P., and Haddad, E.K. (2008) T-cell exhaustion in HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep*, 5(1), 13-19.
- Ellis, T.M., Simms, P.E., Slivnick, D.J., Jack, H.M., and Fisher, R.I. (1993) CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. *J Immunol*, 151(5), 2380-2389.
- Eyerich, K., and Eyerich, S. (2015) Th22 cells in allergic disease. *Allergo J Int*, 24(1), 1-7.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S.R., Schmidt-Weber, C.B.,

- and Cavani, A. (2009) Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*, 119(12), 3573-3585.
- Farber, D.L., Yudanin, N.A., and Restifo, N.P. (2014) Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(1), 24-35.
- Fattovich, G., Vinante, F., Giustina, G., Morosato, L., Alberti, A., Ruol, A., and Pizzolo, G. (1996) Serum levels of soluble CD30 in chronic hepatitis B virus infection. *Clin Exp Immunol*, 103(1), 105-110.
- Femke Broere, Sergei G. Apasov, Michail V. Sitkovsky, and Eden, W.v. (2011) T cell subsets and T cell-mediated immunity. In *Principles of Immunopharmacology: 3rd revised and extended edition* (F.P. Nijkamp, and M.J. Parnham, eds): Springer Basel AG, pp pp 15-27.
- Fiedler, P. (2011) Die Expression von LMP1, LMP2A und CD30 in B-Zellen zur Analyse physiologischer und pathogener Effekte. Dissertation, Fakultät für Biologie, LMU München.
- Foschi, F.G., Gramenzi, A., Castelli, E., Cursaro, C., Pagani, S., Margotti, M., D'Errico, A., Andreone, P., Stefanini, G.F., and Bernardi, M. (2000) Soluble CD30 serum level in HCV-positive chronic active hepatitis: A surrogate marker of disease activity? *Cytokine*, 12(6), 815-818.
- Foy, T.M., Laman, J.D., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., Claassen, E., and Noelle, R.J. (1994) gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J Exp Med*, 180(1), 157-163.
- Freeman, G.J., Wherry, E.J., Ahmed, R., and Sharpe, A.H. (2006) Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med*, 203(10), 2223-2227.
- Gao, G.F., Rao, Z., and Bell, J.I. (2002) Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends Immunol*, 23(8), 408-413.
- Gapin, L., Godfrey, D.I., and Rossjohn, J. (2013) Natural Killer T cell obsession with self-antigens. *Curr Opin Immunol*, 25(2), 168-173.
- Gaspal, F., Bekiaris, V., Kim, M.Y., Withers, D.R., Bobat, S., MacLennan, I.C., Anderson, G., Lane, P.J., and Cunningham, A.F. (2008) Critical synergy of CD30 and OX40 signals in CD4 T cell homeostasis and Th1 immunity to Salmonella. *J Immunol*, 180(5), 2824-2829.
- Gaspal, F.M., Kim, M.Y., McConnell, F.M., Raykundalia, C., Bekiaris, V., and Lane, P.J. (2005) Mice deficient in OX40 and CD30 signals lack memory antibody responses because of deficient CD4 T cell memory. *J Immunol*, 174(7), 3891-3896.
- Gasper, D.J., Tejera, M.M., and Suresh, M. (2014) CD4 T-cell memory generation and maintenance. *Crit Rev Immunol*, 34(2), 121-146.
- Ge, R.T., Zeng, L., Mo, L.H., Xu, L.Z., Zhang, H.P., Yu, H.Q., Zhang, M., Liu, Z.G., Liu, Z.J., and Yang, P.C. (2015) Interaction of TIM4 and TIM3 induces T helper 1 cell apoptosis. *Immunol Res*, Epub ahead of print.
- Georgakis, G.V., Li, Y., Rassidakis, G.Z., Medeiros, L.J., Mills, G.B., and Younes, A. (2006) Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, 132(4), 503-511.
- Gerli, R., Muscat, C., Bistoni, O., Falini, B., Tomassini, C., Agea, E., Tognellini, R., Biagini, P., and Bertotto, A. (1995) High levels of the soluble form of CD30 molecule in rheumatoid arthritis (RA) are expression of CD30+ T cell involvement in the inflamed joints. *Clin Exp Immunol*, 102(3), 547-550.
- Germain, R.N. (2002) T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, 2(5), 309-322.

- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J*, 16(20), 6131-6140.
- Golden-Mason, L., Palmer, B.E., Kassam, N., Townshend-Bulson, L., Livingston, S., McMahon, B.J., Castelblanco, N., Kuchroo, V., Gretch, D.R., and Rosen, H.R. (2009) Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Virol*, 83(18), 9122-9130.
- Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., and Shlomchik, M.J. (2010) PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol*, 11(6), 535-542.
- Gupta, S., and Garg, N.J. (2015) A Two-Component DNA-Prime/Protein-Boost Vaccination Strategy for Eliciting Long-Term, Protective T Cell Immunity against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, 11(5), e1004828.
- Hamann, D., Hilken, C.M., Grogan, J.L., Lens, S.M., Kapsenberg, M.L., Yazdanbakhsh, M., and van Lier, R.A. (1996) CD30 expression does not discriminate between human Th1- and Th2-type T cells. *J Immunol*, 156(4), 1387-1391.
- Hanihara-Tatsuzawa, F., Miura, H., Kobayashi, S., Isagawa, T., Okuma, A., Manabe, I., and Maruyama, T. (2014) Control of Toll-like receptor-mediated T cell-independent type 1 antibody responses by the inducible nuclear protein IkappaB-zeta. *J Biol Chem*, 289(45), 30925-30936.
- Hansen, H.P., Dietrich, S., Kisseleva, T., Mokros, T., Mentlein, R., Lange, H.H., Murphy, G., and Lemke, H. (2000) CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol*, 165(12), 6703-6709.
- Hansen, H.P., Kisseleva, T., Kobarg, J., Horn-Lohrens, O., Havsteen, B., and Lemke, H. (1995) A zinc metalloproteinase is responsible for the release of CD30 on human tumor cell lines. *Int J Cancer*, 63(5), 750-756.
- Hapgood, G., and Savage, K.J. (2015) The biology and management of systemic anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 126(1), 17-25.
- Haque, T., Chaggar, T., Schafers, J., Atkinson, C., McAulay, K.A., and Crawford, D.H. (2011) Soluble CD30: a serum marker for Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative diseases. *J Med Virol*, 83(2), 311-316.
- Hargreaves, P.G., and Al-Shamkhani, A. (2002) Soluble CD30 binds to CD153 with high affinity and blocks transmembrane signaling by CD30. *Eur J Immunol*, 32(1), 163-173.
- Harlin, H., Podack, E., Boothby, M., and Alegre, M.L. (2002) TCR-independent CD30 signaling selectively induces IL-13 production via a TNF receptor-associated factor/p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J Immunol*, 169(5), 2451-2459.
- Hartmann, M., Parra, L.M., Ruschel, A., Bohme, S., Li, Y., Morrison, H., Herrlich, A., and Herrlich, P. (2015) Tumor Suppressor NF2 Blocks Cellular Migration by Inhibiting Ectodomain Cleavage of CD44. *Mol Cancer Res*, 13(5), 879-890.
- Harty, J.T., and Badovinac, V.P. (2008) Shaping and reshaping CD8<sup>+</sup> T-cell memory. *Nat Rev Immunol*, 8(2), 107-119.
- Hastings, W.D., Anderson, D.E., Kassam, N., Koguchi, K., Greenfield, E.A., Kent, S.C., Zheng, X.X., Strom, T.B., Hafler, D.A., and Kuchroo, V.K. (2009) TIM-3 is expressed on activated human CD4<sup>+</sup> T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol*, 39(9), 2492-2501.
- Hehlhans, T., and Pfeffer, K. (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115(1), 1-20.

- Hemmings, B.A., and Restuccia, D.F. (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a011189.
- Herbst, H., and Stein, H. (1993) Tumor viruses in CD30-positive anaplastic large cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*, 9(4-5), 321-328.
- Hernandez, J., Aung, S., Redmond, W.L., and Sherman, L.A. (2001) Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med*, 194(6), 707-717.
- Hirsch, B., Hummel, M., Bentink, S., Fouladi, F., Spang, R., Zollinger, R., Stein, H., and Durkop, H. (2008) CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. *Am J Pathol*, 172(2), 510-520.
- Hirsch, B., von der Wall, E., Hummel, M., and Durkop, H. (2013) RIP1 expression is necessary for CD30-mediated cell death induction in anaplastic large-cell lymphoma cells. *Lab Invest*, 93(6), 677-689.
- Ho, D.S., Rea, A.J., and Abraham, L.J. (2009) Functional aspects of the CD30 gene in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Oncology Reviews*, Volume 3, Issue 2, pp 89-101
- Hokey, D.A., Johnson, F.B., Smith, J., Weber, J.L., Yan, J., Hirao, L., Boyer, J.D., Lewis, M.G., Makedonas, G., Betts, M.R., and Weiner, D.B. (2008) Activation drives PD-1 expression during vaccine-specific proliferation and following lentiviral infection in macaques. *Eur J Immunol*, 38(5), 1435-1445.
- Hömig-Hölzel, C., Hojer, C., Rastelli, J., Casola, S., Strobl, L.J., Muller, W., Quintanilla-Martinez, L., Gewies, A., Ruland, J., Rajewsky, K., and Zimmer-Strobl, U. (2008) Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med*, 205(6), 1317-1329.
- Horie, R., and Watanabe, T. (1998) CD30: expression and function in health and disease. *Semin Immunol*, 10(6), 457-470.
- Hu, J., and August, A. (2008) Naive and innate memory phenotype CD4+ T cells have different requirements for active Itk for their development. *J Immunol*, 180(10), 6544-6552.
- Huster, K.M., Koffler, M., Stemberger, C., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2006) Unidirectional development of CD8+ central memory T cells into protective Listeria-specific effector memory T cells. *Eur J Immunol*, 36(6), 1453-1464.
- Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006) The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121-1133.
- Ivanova, E.A., and Orekhov, A.N. (2015) T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *Biomed Res Int*, 2015(327470), 327470.
- Janeway, Murphy K, Walport MJ, and Travers P. (2014) *Janeway's Immunobiology*, .
- Jiang, S., and Dong, C. (2013) A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunol Rev*, 252(1), 5-11.
- Jiang, Y., Li, Y., and Zhu, B. (2015) T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis*, 6(18), e1792.
- Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009) Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*, 325(5943), 1006-1010.
- Jourdan, M., Caraux, A., De Vos, J., Fiol, G., Larroque, M., Cognot, C., Bret, C., Duperray, C., Hose, D., and Klein, B. (2009) An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*, 114(25), 5173-5181.

- Kadin, M.E. (2000) Regulation of CD30 antigen expression and its potential significance for human disease. *Am J Pathol*, 156(5), 1479-1484.
- Kadin, M.E., Pavlov, I.Y., Delgado, J.C., and Vonderheid, E.C. (2012) High soluble CD30, CD25, and IL-6 may identify patients with worse survival in CD30+ cutaneous lymphomas and early mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*, 132(3 Pt 1), 703-710.
- Kaech, S.M., and Cui, W. (2012) Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 12(11), 749-761.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*, 2(4), 251-262.
- Kaplan, M.H. (2013) Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev*, 252(1), 104-115.
- Kaufman, G.N., Massoud, A.H., Dembele, M., Yona, M., Piccirillo, C.A., and Mazer, B.D. (2015) Induction of Regulatory T Cells by Intravenous Immunoglobulin: A Bridge between Adaptive and Innate Immunity. *Front Immunol*, 6(469), 4699.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 26, 677-704.
- Kennedy, M.K., Willis, C.R., and Armitage, R.J. (2006) Deciphering CD30 ligand biology and its role in humoral immunity. *Immunology*, 118(2), 143-152.
- Khaitan, A., and Unutmaz, D. (2011) Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep*, 8(1), 4-11.
- Kim, J.S., and Jordan, M.S. (2013) Diversity of IL-17-producing T lymphocytes. *Cell Mol Life Sci*, 70(13), 2271-2290.
- Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008) Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*, 8(1), 22-33.
- Koch, U., and Radtke, F. (2011) Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 539-562.
- Koorella, C., Nair, J.R., Murray, M.E., Carlson, L.M., Watkins, S.K., and Lee, K.P. (2014) Novel regulation of CD80/CD86-induced phosphatidylinositol 3-kinase signaling by NOTCH1 protein in interleukin-6 and indoleamine 2,3-dioxygenase production by dendritic cells. *J Biol Chem*, 289(11), 7747-7762.
- Krishnan, L., Gurnani, K., Dicaire, C.J., van Faassen, H., Zafer, A., Kirschning, C.J., Sad, S., and Sprott, G.D. (2007) Rapid clonal expansion and prolonged maintenance of memory CD8+ T cells of the effector (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>) and central (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup>) phenotype by an archaeosome adjuvant independent of TLR2. *J Immunol*, 178(4), 2396-2406.
- Krysov, S.V., Rowley, T.F., and Al-Shamkhani, A. (2007) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase unmasks a CD30-triggered apoptotic pathway in anaplastic large cell lymphoma cells. *Mol Cancer Ther*, 6(2), 703-711.
- Kumar, A., and Younes, A. (2014) Role of CD30 targeting in malignant lymphoma. *Curr Treat Options Oncol*, 15(2), 210-225.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259), 680-685.
- Lai, R., Rassidakis, G.Z., Medeiros, L.J., Ramdas, L., Goy, A.H., Cutler, C., Fujio, Y., Kunisada, K., Amin, H.M., and Gilles, F. (2004) Signal transducer and activator of transcription-3 activation contributes to high tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol*, 164(6), 2251-2258.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., and Berns, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 19(15), 4293.
- Lee, H.J., Lee, E.K., Seo, Y.E., Shin, Y.H., Kim, H.S., Chun, Y.H., Yoon, J.S., Kim, H.H., Han, M.Y., Kim, C.K., Kim, K.E., Koh, Y.Y., and Kim, J.T. (2015) Roles of Bcl-2

- and caspase-9 and -3 in CD30-induced human eosinophil apoptosis. *J Microbiol Immunol Infect*, 2015(30), 00773-00772.
- Lee, P.P., Fitzpatrick, D.R., Beard, C., Jessup, H.K., Lehar, S., Makar, K.W., Perez-Melgosa, M., Sweetser, M.T., Schlissel, M.S., Nguyen, S., Cherry, S.R., Tsai, J.H., Tucker, S.M., Weaver, W.M., Kelso, A., Jaenisch, R., and Wilson, C.B. (2001) A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity*, 15(5), 763-774.
- Levi, E., Pfeifer, W.M., and Kadin, M.E. (2001) CD30-activation-mediated growth inhibition of anaplastic large-cell lymphoma cell lines: apoptosis or cell-cycle arrest? *Blood*, 98(5), 1630-1632.
- Li, X., and Zheng, Y. (2015) Regulatory T cell identity: formation and maintenance. *Trends Immunol*, 36(6), 344-353.
- Linterman, M.A., and Vinuesa, C.G. (2010) Signals that influence T follicular helper cell differentiation and function. *Semin Immunopathol*, 32(2), 183-196.
- Liu, X., Nurieva, R.I., and Dong, C. (2013) Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. *Immunol Rev*, 252(1), 139-145.
- Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. (2012) The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med*, 209(7), 1241-1253.
- Market, E., and Papavasiliou, F.N. (2003) V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol*, 1(1), E16.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001) Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, 14(5), 617-629.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6(13), 13.
- Martins, R., Lithgow, G.J., and Link, W. (2015) Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell*, 2015(8), 12427.
- Matthey, B., Borchmann, P., Schnell, R., Tawadros, S., Lange, H., Huhn, M., Klimka, A., Tur, M.K., Barth, S., Engert, A., and Hansen, H.P. (2004) Metalloproteinase inhibition augments antitumor efficacy of the anti-CD30 immunotoxin Ki-3(scFv)-ETA' against human lymphomas in vivo. *Int J Cancer*, 111(4), 568-574.
- McGary, C.S., Silvestri, G., and Paiardini, M. (2014) Animal models for viral infection and cell exhaustion. *Curr Opin HIV AIDS*, 9(5), 492-499.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005) Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*, 5(8), 606-616.
- Medana, I.M., Gallimore, A., Oxenius, A., Martinic, M.M., Wekerle, H., and Neumann, H. (2000) MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur J Immunol*, 30(12), 3623-3633.
- Mir, S.S., Richter, B.W., and Duckett, C.S. (2000) Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood*, 96(13), 4307-4312.
- Moens, L., and Tangye, S.G. (2014) Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front Immunol*, 5(65), 65.
- Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2013) Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol*, 31, 137-161.
- Nadali, G., Vinante, F., Ambrosetti, A., Todeschini, G., Veneri, D., Zanotti, R., Meneghini, V., Ricetti, M.M., Benedetti, F., Vassanelli, A., and et al. (1994) Serum levels of soluble CD30 are elevated in the majority of untreated patients with Hodgkin's disease and correlate with clinical features and prognosis. *J Clin Oncol*, 12(4), 793-797.
- Nie, J., Li, Y.Y., Zheng, S.G., Tsun, A., and Li, B. (2015) FOXP3(+) Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 6(493), 493.

- Nishikori, M., Ohno, H., Haga, H., and Uchiyama, T. (2005) Stimulation of CD30 in anaplastic large cell lymphoma leads to production of nuclear factor-kappaB p52, which is associated with hyperphosphorylated Bcl-3. *Cancer Sci*, 96(8), 487-497.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11(2), 141-151.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y.H., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., and Dong, C. (2008) Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*, 29(1), 138-149.
- Obukhanych, T.V., and Nussenzweig, M.C. (2006) T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med*, 203(2), 305-310.
- Oelmann, E., Herbst, H., Zuhlsdorf, M., Albrecht, O., Nolte, A., Schmitzmann, C., Manzke, O., Diehl, V., Stein, H., and Berdel, W.E. (2002) Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*, 99(1), 258-267.
- Okada, T., Miller, M.J., Parker, I., Krummel, M.F., Neighbors, M., Hartley, S.B., O'Garra, A., Cahalan, M.D., and Cyster, J.G. (2005) Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol*, 3(6), e150.
- Okamoto, I., Kawano, Y., Tsuiki, H., Sasaki, J., Nakao, M., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Nakajima, M., and Saya, H. (1999) CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene*, 18(7), 1435-1446.
- Opata, M.M., and Stephens, R. (2013) Early Decision: Effector and Effector Memory T Cell Differentiation in Chronic Infection. *Curr Immunol Rev*, 9(3), 190-206.
- Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R.A., and Li, M.O. (2009) An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity*, 30(3), 358-371.
- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.P., Wang, G., Qi, C.F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., Morse, H.C., 3rd, Lipsky, P.E., and Leonard, W.J. (2004) Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol*, 173(9), 5361-5371.
- Park, H.H., Lo, Y.C., Lin, S.C., Wang, L., Yang, J.K., and Wu, H. (2007) The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol*, 25, 561-586.
- Patel, D.D., and Kuchroo, V.K. (2015) Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. *Immunity*, 43(6), 1040-1051.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2), 153-183.
- Peng, S.L. (2008) Foxo in the immune system. *Oncogene*, 27(16), 2337-2344.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., and Kedl, R.M. (2013) T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ*, 37(4), 273-283.
- Petkova, D., Xaubet, A., Picado, C., Filella, X., Agusti, C., Luburich, P., and Rodriguez-Roisin, R. (2000) Evaluation of CD30 as a marker for th2 lymphocytes in bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases. *Respir Med*, 94(4), 345-349.
- Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S.T. (2005) Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*, 23, 161-196.

- Pizzolo, G., and Romagnani, S. (1995) CD30 molecule (Ki-1 Ag): more than just a marker of CD30+ lymphoma. *Haematologica*, 80(4), 357-366.
- Punkosdy, G.A., Blain, M., Glass, D.D., Lozano, M.M., O'Mara, L., Dudley, J.P., Ahmed, R., and Shevach, E.M. (2011) Regulatory T-cell expansion during chronic viral infection is dependent on endogenous retroviral superantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(9), 3677-3682.
- Radziewicz, H., Ibegbu, C.C., Fernandez, M.L., Workowski, K.A., Obideen, K., Wehbi, M., Hanson, H.L., Steinberg, J.P., Masopust, D., Wherry, E.J., Altman, J.D., Rouse, B.T., Freeman, G.J., Ahmed, R., and Grakoui, A. (2007) Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol*, 81(6), 2545-2553.
- Randall, T.D., Heath, A.W., Santos-Argumedo, L., Howard, M.C., Weissman, I.L., and Lund, F.E. (1998) Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity*, 8(6), 733-742.
- Rapti, M., Atkinson, S.J., Lee, M.H., Trim, A., Moss, M., and Murphy, G. (2008) The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition. *Biochem J*, 411(2), 433-439.
- Rincon, M. (2001) MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol*, 13(3), 339-345.
- Rincon, M., and Davis, R.J. (2009) Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol Rev*, 228(1), 212-224.
- Rizzardi, G.P., Barcellini, W., Tambussi, G., Lillo, F., Malnati, M., Perrin, L., and Lazzarin, A. (1996) Plasma levels of soluble CD30, tumour necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors during primary HIV-1 infection: correlation with HIV-1 RNA and the clinical outcome. *Aids*, 10(13), F45-50.
- Romagnani, S., Annunziato, F., Manetti, R., Almerigogna, F., Biagiotti, R., Giudizi, M.G., Ravina, A., Gianno, V., Tomasevic, L., and Maggi, E. (1996) Role for CD30 in HIV expression. *Immunol Lett*, 51(1-2), 83-88.
- Romagnani, S., Del Prete, G., Maggi, E., Chilosi, M., Caligaris-Cappio, F., and Pizzolo, G. (1995) CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol*, 57(5), 726-730.
- Sabatos, C.A., Chakravarti, S., Cha, E., Schubart, A., Sanchez-Fueyo, A., Zheng, X.X., Coyle, A.J., Strom, T.B., Freeman, G.J., and Kuchroo, V.K. (2003) Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol*, 4(11), 1102-1110.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775-787.
- Salti, S.M., Hammelev, E.M., Grewal, J.L., Reddy, S.T., Zemple, S.J., Grossman, W.J., Grayson, M.H., and Verbsky, J.W. (2011) Granzyme B regulates antiviral CD8+ T cell responses. *J Immunol*, 187(12), 6301-6309.
- Sambrook, and Russel, D. (2002) *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. 2222.
- Sancho, D., Gomez, M., and Sanchez-Madrid, F. (2005) CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*, 26(3), 136-140.
- Schenkel, J.M., and Masopust, D. (2014) Tissue-resident memory T cells. *Immunity*, 41(6), 886-897.



- Schietinger, A., and Greenberg, P.D. (2014) Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol*, 35(2), 51-60.
- Schirmacher, V., Schild, H.J., Guckel, B., and von Hoegen, P. (1993) Tumour-specific CTL response requiring interactions of four different cell types and recognition of MHC class I and class II restricted tumour antigens. *Immunol Cell Biol*, 71 ( Pt 4)(Pt 4), 311-326.
- Schirmann, T., Steinwand, M., Wezler, X., Ten Haaf, A., Tur, M.K., and Barth, S. (2014) CD30 as a therapeutic target for lymphoma. *BioDrugs*, 28(2), 181-209.
- Schmidt, J., Blum, H.E., and Thimme, R. (2013) T-cell responses in hepatitis B and C virus infection: similarities and differences. *Emerg Microbes Infect*, 2(3), e15.
- Schneider, C., and Hübinger, G. (2002) Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. *Leuk Lymphoma*, 43(7), 1355-1366.
- Schneider, C., Stohr, D., Merz, H., and Hubinger, G. (2004) Signal transduction in anaplastic large cell lymphoma cells (ALCL) mediated by the tumor necrosis factor receptor CD30. *Leuk Lymphoma*, 45(5), 1009-1015.
- Schnell, R., Staak, O., Borchmann, P., Schwartz, C., Matthey, B., Hansen, H., Schindler, J., Ghetie, V., Vitetta, E.S., Diehl, V., and Engert, A. (2002) A Phase I study with an anti-CD30 ricin A-chain immunotoxin (Ki-4.dgA) in patients with refractory CD30+ Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*, 8(6), 1779-1786.
- Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M., and Diehl, V. (1982) Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*, 299(5878), 65-67.
- Sciaranghella, G., Tong, N., Mahan, A.E., Suscovich, T.J., and Alter, G. (2012) Decoupling activation and exhaustion of B cells in spontaneous controllers of HIV infection. *Aids*, 27(2), 175-180.
- Shankar, S., Chen, Q., and Srivastava, R.K. (2008) Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways act synergistically to enhance antiangiogenic effects of EGCG through activation of FOXO transcription factor. *J Mol Signal*, 3(7), 7.
- Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R., and Freeman, G.J. (2007) The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*, 8(3), 239-245.
- Shekhar, S., and Yang, X. (2012) The darker side of follicular helper T cells: from autoimmunity to immunodeficiency. *Cell Mol Immunol*, 9(5), 380-385.
- Silvy, A., Lagresle, C., Bella, C., and Defrance, T. (1996) The differentiation of human memory B cells into specific antibody-secreting cells is CD40 independent. *Eur J Immunol*, 26(3), 517-524.
- Sledzinska, A., Hemmers, S., Mair, F., Gorka, O., Ruland, J., Fairbairn, L., Nissler, A., Muller, W., Waisman, A., Becher, B., and Buch, T. (2013) TGF-beta signalling is required for CD4(+) T cell homeostasis but dispensable for regulatory T cell function. *PLoS Biol*, 11(10), e1001674.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009) T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 27, 591-619.
- Smith, C.A., Farrah, T., and Goodwin, R.G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76(6), 959-962.
- Stein, H., Foss, H.D., Durkop, H., Marafioti, T., Delsol, G., Pulford, K., Pileri, S., and Falini, B. (2000) CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*, 96(12), 3681-3695.
- Stein, H., Mason, D.Y., Gerdes, J., O'Connor, N., Wainscoat, J., Pallesen, G., Gatter, K., Falini, B., Delsol, G., Lemke, H., and et al. (1985) The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence

- that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*, 66(4), 848-858.
- Steinman, R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 9, 271-296.
- Suh, W.K. (2015) Life of T follicular helper cells. *Mol Cells*, 38(3), 195-201
- Sumida, K., Shimoda, S., Iwasaka, S., Hisamoto, S., Kawanaka, H., Akahoshi, T., Ikegami, T., Shirabe, K., Shimono, N., Maehara, Y., Selmi, C., Gershwin, M.E., and Akashi, K. (2013) Characteristics of splenic CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion in patients with hepatitis C. *Clin Exp Immunol*, 174(1), 172-178.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., and Huston, G. (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol*, 145(11), 3796-3806.
- Tanel, A., Fonseca, S.G., Yassine-Diab, B., Bordi, R., Zeidan, J., Shi, Y., Benne, C., and Sekaly, R.P. (2009) Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival. *Expert Rev Vaccines*, 8(3), 299-312.
- Tang, C., Yamada, H., Shibata, K., Muta, H., Wajjwalku, W., Podack, E.R., and Yoshikai, Y. (2008) A novel role of CD30L/CD30 signaling by T-T cell interaction in Th1 response against mycobacterial infection. *J Immunol*, 181(9), 6316-6327.
- Telford, W.G., Nam, S.Y., Podack, E.R., and Miller, R.A. (1997) CD30-regulated apoptosis in murine CD8 T cells after cessation of TCR signals. *Cell Immunol*, 182(2), 125-136.
- Toennies, H.M., Green, J.M., and Arch, R.H. (2004) Expression of CD30 and Ox40 on T lymphocyte subsets is controlled by distinct regulatory mechanisms. *J Leukoc Biol*, 75(2), 350-357.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354.
- Tzivion, G., Dobson, M., and Ramakrishnan, G. (2011) FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1813(11), 1938-1945.
- Ucar, O., and Rattay, K. (2015) Promiscuous Gene Expression in the Thymus: A Matter of Epigenetics, miRNA, and More? *Front Immunol*, 6(93), 93.
- Umetsu, S.E., Lee, W.L., McIntire, J.J., Downey, L., Sanjanwala, B., Akbari, O., Berry, G.J., Nagumo, H., Freeman, G.J., Umetsu, D.T., and DeKruyff, R.H. (2005) TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol*, 6(5), 447-454.
- Vahdat, A.M., Reinert, K.S., Simhadri, V.L., Eichenauer, D.A., Boll, B., Chalaris, A., Simhadri, V.R., Wiegmann, K., Krell, H.W., Rose-John, S., Engert, A., von Strandmann, E.P., and Hansen, H.P. (2010) TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-dependent loss of CD30 induced by proteasome inhibition through reactive oxygen species. *Leukemia*, 24(1), 51-57.
- Veiga-Parga, T., Sehrawat, S., and Rouse, B.T. (2013) Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol Rev*, 255(1), 182-196.
- Velasquez, S.Y., Garcia, L.F., Opelz, G., Alvarez, C.M., and Susal, C. (2013) Release of soluble CD30 after allogeneic stimulation is mediated by memory T cells and regulated by IFN-gamma and IL-2. *Transplantation*, 96(2), 154-161.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179-189.
- Veldhoen, M., Uytendhoeve, C., van Snick, J., Helmbj, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008) Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 9(12), 1341-1346.

- Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012) Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 30, 429-457.
- Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Goodnow, C.C., and Randall, K.L. (2010) T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol Rev*, 237(1), 72-89.
- von Boehmer, H. (2014) The thymus in immunity and in malignancy. *Cancer Immunol Res*, 2(7), 592-597.
- Wang, J., Okazaki, I.M., Yoshida, T., Chikuma, S., Kato, Y., Nakaki, F., Hiai, H., Honjo, T., and Okazaki, T. (2010) PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *Int Immunol*, 22(6), 443-452.
- Watanabe, M., Itoh, K., Togano, T., Kadin, M.E., Watanabe, T., Higashihara, M., and Horie, R. (2012) Ets-1 activates overexpression of JunB and CD30 in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma. *Am J Pathol*, 180(2), 831-838.
- Watanabe, M., Sasaki, M., Itoh, K., Higashihara, M., Umezawa, K., Kadin, M.E., Abraham, L.J., Watanabe, T., and Horie, R. (2005) JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*, 65(17), 7628-7634.
- Weinstein, J.S., Bertino, S.A., Hernandez, S.G., Poholek, A.C., Teplitzky, T.B., Nowyhed, H.N., and Craft, J. (2014) B cells in T follicular helper cell development and function: separable roles in delivery of ICOS ligand and antigen. *J Immunol*, 192(7), 3166-3179.
- Wherry, E.J. (2011) T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12(6), 492-499.
- Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., and Ahmed, R. (2003) Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*, 77(8), 4911-4927.
- Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015) Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 15(8), 486-499.
- Wiley, S.R., Goodwin, R.G., and Smith, C.A. (1996) Reverse signaling via CD30 ligand. *J Immunol*, 157(8), 3635-3639.
- Wolniak, K.L., Shinall, S.M., and Waldschmidt, T.J. (2004) The germinal center response. *Crit Rev Immunol*, 24(1), 39-65.
- Wong, P., and Pamer, E.G. (2003) CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol*, 21, 29-70.
- Yamamoto, J., Adachi, Y., Onoue, Y., Kanegane, H., Miyawaki, T., Toyoda, M., Seki, T., and Morohashi, M. (2000) CD30 expression on circulating memory CD4<sup>+</sup> T cells as a Th2-dominated situation in patients with atopic dermatitis. *Allergy*, 55(11), 1011-1018.
- Yamashita, M., Shinnakasu, R., Asou, H., Kimura, M., Hasegawa, A., Hashimoto, K., Hatano, N., Ogata, M., and Nakayama, T. (2005) Ras-ERK MAPK cascade regulates GATA3 stability and Th2 differentiation through ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 280(33), 29409-29419.
- Yang, F., Wei, Y., Cai, Z., Yu, L., Jiang, L., Zhang, C., Yan, H., Wang, Q., Cao, X., Liang, T., and Wang, J. (2015) Activated cytotoxic lymphocytes promote tumor progression by increasing the ability of 3LL tumor cells to mediate MDSC chemoattraction via Fas signaling. *Cell Mol Immunol*, 12(1), 66-76.
- Yang, M., and Huang, C.Z. (2015) Mitogen-activated protein kinase signaling pathway and invasion and metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 21(41), 11673-11679.

- Yang, S., Liu, F., Wang, Q.J., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2011) The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS ONE*, 6(7), e22560.
- Yang, Z., Zhang, X., Darrah, P.A., and Mosser, D.M. (2010) The regulation of Th1 responses by the p38 MAPK. *J Immunol*, 185(10), 6205-6213.
- Ye, B., Liu, X., Li, X., Kong, H., Tian, L., and Chen, Y. (2015) T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death Dis*, 6(19), e1694.
- Yi, J.S., Cox, M.A., and Zajac, A.J. (2010) T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*, 129(4), 474-481.
- Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J., Suresh, M., Altman, J.D., and Ahmed, R. (1998) Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*, 188(12), 2205-2213.
- Zarin, P., Chen, E.L., In, T.S., Anderson, M.K., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2015) Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? *Cell Immunol*, 296(1), 70-75.
- Zelenay, S., Lopes-Carvalho, T., Caramalho, I., Moraes-Fontes, M.F., Rebelo, M., and Demengeot, J. (2005) Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(11), 4091-4096.
- Zhang, L., Li, Z., Wan, Z., Kilby, A., Kilby, J.M., and Jiang, W. (2015) Humoral immune responses to *Streptococcus pneumoniae* in the setting of HIV-1 infection. *Vaccine*, 33(36), 4430-4436.
- Zhang, Q., and Lakkis, F.G. (2015) Memory T Cell Migration. *Front Immunol*, 6(504), 504.
- Zheng, B., Fiumara, P., Li, Y.V., Georgakis, G., Snell, V., Younes, M., Vauthey, J.N., Carbone, A., and Younes, A. (2003) MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood*, 102(3), 1019-1027.
- Zheng, H., Jin, B., Henrickson, S.E., Perelson, A.S., von Andrian, U.H., and Chakraborty, A.K. (2008) How antigen quantity and quality determine T-cell decisions in lymphoid tissue. *Mol Cell Biol*, 28(12), 4040-4051.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*, 28, 445-489.
- Zietara, N., Lyszkiewicz, M., Krueger, A., and Weiss, S. (2011) ICOS-dependent stimulation of NKT cells by marginal zone B cells. *Eur J Immunol*, 41(11), 3125-3134.

## 10 Publikationen

**Pollithy A**, Fiedler P, Scheffler L, Strobl L, Zimmer-Strobl U.

A CD30 dependent mechanism leads to the differentiation of T<sub>H</sub>1 cells and inhibition of follicular t helper cell development (working title)

manuscript in preparation

Borg S, Hofmann J, **Pollithy A**, Lang C, Schüler D.

New vectors for chromosomal integration enable high-level constitutive or inducible magnetosome expression of fusion proteins in *Magnetospirillum gryphiswaldense*.

Appl Environ Microbiol. 2014 Apr;80(8):2609-16.

**Pollithy A**, Romer T, Lang C, Müller FD, Helma J, Leonhardt H, Rothbauer U, Schüler D.

Magnetosome expression of functional camelid antibody fragments (nanobodies) in *Magnetospirillum gryphiswaldense*.

Appl Environ Microbiol. 2011 Sep;77(17):6165-71.

Lang C, **Pollithy A**, Schüler D.

Identification of promoters for efficient gene expression in *Magnetospirillum gryphiswaldense*.

Appl Environ Microbiol. 2009 Jun;75(12):4206-10.

## **11 Lebenslauf**

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die es ermöglicht haben, diese Doktorarbeit zu erstellen:

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Betreuerin PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl für die Möglichkeit meine Dissertation in ihrem Labor anzufertigen, für die Bereitstellung des interessanten Themas, die konstruktiven Diskussionen und dafür, dass sie bei Fragen und Problemen jederzeit zur Verfügung stand.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater PD Dr. Josef Mautner für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Gutachtern, besonders bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für das Erstellen des Zweitgutachtens, bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre, ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Bei Anne, Samantha und Steffi Z. für die aufmunternden Gespräche bei den Kaffeepausen. Bei Steffi E. für viele gute Labor-Tipps und Tricks und für die Geduld mir manche Dinge zweimal zu erklären. Vielen Dank Lothar Strobl für die vielen Anregungen und für die Hilfe bei der Literaturrecherche und an Gabi für die Hilfe bei den ELISAs.

Ein großer Dank geht an den Mitglieder des Tierstalls, vor allem an Martina, für die gute Betreuung meiner Mausstämme.

Ein ganz, ganz großes Dankeschön geht an meine Familie, die mich immer unterstützt hat, sowie an Dario, der mir immer wieder Mut zugesprochen hat und jederzeit für mich da war. Ohne euch hätte ich das alles nicht geschafft!

Diese Dissertation wurde von Juni 2011 bis Oktober 2015 in der Abteilung für Genvektoren des Helmholtz Zentrums München in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl erstellt und von PD. Dr. Josef Mautner betreut.

### **13 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 21.01.2016

---

Anna Pollithy

### **14 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 21.01.2016

---

Anna Pollithy